



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PAMELA PONTES HENRIQUE

**CARACTERIZAÇÃO DE CNVS PATOGÊNICAS EM QUATRO INDIVÍDUOS
DO SEXO MASCULINO COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LIGADA AO X**

CAMPINAS

2019

PAMELA PONTES HENRIQUE

CARACTERIZAÇÃO DE CNVS PATOGÊNICAS EM QUATRO INDIVÍDUOS DO
SEXO MASCULINO COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LIGADA AO X

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora
em Ciências, área de concentração em Genética Médica.*

Orientadora: Dr^a Antonia Paula Marques de Faria
Coorientadora: Dr^a Maricilda Palandi de Mello

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PAMELA
PONTES HENRIQUE, E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

H39c Henrique, Pamela Pontes, 1990-
Caracterização de CNVS patogênicas em quatro indivíduos do sexo masculino com deficiência intelectual ligada ao X / Pamela Pontes Henrique. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Antonia Paula Marques de Faria.
Coorientador: Maricilda Palandi de Mello.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Deficiência intelectual. 2. Cromossomo X. 3. Variações do número de cópias de DNA. 4. Hibridização genômica comparativa. I. Faria, Antonia Paula Marques de, 1957-. II. Mello, Maricilda Palandi de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of pathogenic CNVS in four male individuals with X-linked intellectual disability

Palavras-chave em inglês:

Intellectual disability

X chromosome

DNA copy number variations

Comparative genomic hybridization

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Antonia Paula Marques de Faria [Orientador]

Ana Beatriz Alvarez Perez

Andréa Trevas Maciel Guerra

Edi Lúcia Sartorato

Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

Data de defesa: 30-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9589-9116>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3843653790936066>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
PAMELA PONTES HENRIQUE

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA

COORIENTADOR: PROF^a. DR^a. MARICILDA PALANDI DE MELLO

MEMBROS:

1. PROF^a. DR^a. ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA

2. PROF^a. DR^a. ANA BEATRIZ ALVAREZ PEREZ

3. PROF^a. DR^a. ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

4. PROF^a. DR^a. EDI LÚCIA SARTORATO

5. PROF^a. DR^a. MARIA ISABEL DE SOUZA ARANHA MELARAGNO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 30 de Julho de 2019

*Dedico este trabalho a cada rostinho especial
que convive com alguma deficiência.*

AGRADECIMENTOS

À querida Antonia pela dedicação com que me orientou durante esses anos. Você me ensina muito além do que a ciência pode ensinar. De todo coração, muito obrigada!

À querida Maricilda por todo seu carinho e amizade, mas, sobretudo, sua coorientação que há anos tem contribuído para o meu aprendizado profissional, bem como muito sobre a vida. Professora, muito obrigada por tudo!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 158986/2015-6) pela bolsa de estudos concedida.

Aos pacientes e seus familiares por consentirem a participação neste estudo.

Aos residentes em Genética Clínica e à equipe de enfermeiras por auxiliarem no atendimento aos pacientes e na coleta das amostras.

À Profa. Dra. Iscia L. Cendes pelo apoio científico.

Aos queridos Ana Paula, Fábio, Ilária e Joana pela colaboração nos experimentos de microarray.

À banca examinadora de qualificação e defesa, Profas. Dras. Ana Beatriz A. Perez, Andréa T. M. Guerra, Edi L. Sartorato, Mara S. Guaragna e Maria Isabel S. A. Melaragno por terem aceitado gentilmente a participação e pelas contribuições valiosas na elaboração da minha tese de doutorado. Agradeço também aos membros suplentes.

Aos queridos colegas Adriana, Helena, Luana, Mara, Marcela, Matheus, Nadya, Paulo, Priscila, Roseane e Sueli, e a todos aqueles que estiveram conosco no laboratório durante esses quase oito anos, pela amizade e experiências compartilhadas.

À querida Profa. Dra. Edi por me acolher no laboratório, estar sempre disposta a ajudar e pelos momentos de descontração que nos proporciona.

A todos os funcionários do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, do Comitê de Ética em Pesquisa, do Departamento de Genética Médica, e de Pós-graduação em Ciências Médicas; em especial aos secretários Caio, Gabriela, Márcia, Rodrigo e Rosana, e à técnica Daniela, pelos esclarecimentos e ajuda com procedimentos.

Aos professores que contrubuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante minha jornada acadêmica.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, minha Luz, e Maria Desatadora dos Nós por sempre guiarem os meus caminhos e concederem a mim o amor e coragem necessários para seguir adiante.

Aos meus pais Marco Aurélio e Monica, meu alicerce e a quem devo tudo. Obrigada por abraçarem a todos os meus sonhos. De vocês vem o meu impulso e por vocês movo o mundo. Amo-os incondicionalmente.

Ao meu amado esposo Rogério. Obrigada por aceitar caminhar essa vida ao meu lado. Seu amor me motiva a me tornar uma pessoa melhor!

Ao meu “cãopanheiro” Benjamin pelo amor genuíno dedicado a mim e a nossa família, nosso anjo protetor!

Ao meu amado avô Walter pela bênção de tê-lo conosco. Obrigada pelo seu exemplo de vida e todo seu apoio em minha jornada. Te amo para sempre!

À minha querida tia-avó Irene por todo seu afeto, suas palavras de sabedoria e constantes orações.

Às minhas sobrinhas do coração Luíza e Milena. Mesmo tão pequenas souberam me dar um amor tão grande e me ensinaram a amar tão grandemente o pequeno.

À minha querida amiga Laura. Obrigada por ser minha irmã de vida e por me guardar dentro desse seu coração enorme. Amo você!

Aos meus sogros Selma e Wilson, e ao meu cunhado Rodrigo. Obrigada por me acolherem quando estou longe de casa.

A todos em minha família que me apoiam, torcem pelo meu sucesso e felicidade.

À minha querida amiga Taís, expressão física do cuidado e do amor de Deus por mim. Agradeço todos os dias pela sua vida e pela sensibilidade que Ele lhe deu para acolher as pessoas. Amo você!

À minha querida amiga Giselle pela cumplicidade em todos os momentos. Você fez tanto por mim que nenhuma palavra seria suficiente para expressar a minha gratidão. Obrigada por tudo!

À minha querida amiga Carolina, companheira do início, amiga de sempre e eterna madrinha profissional. Obrigada por todo seu auxílio, pelas palavras de incentivo e todo carinho comigo!

Aos queridos amigos e amigas que moram em meu coração, especialmente àqueles a quem posso chamar de família: Aline, Jéssica, Nathalia, Paulo e Victor. Sou muito abençoada por tê-los em minha vida!

A todos vocês, o meu mais sincero obrigada!

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas
ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.”*

Carl Gustav Jung

RESUMO

A deficiência intelectual ligada ao X (DILX) é uma das causas genéticas mais frequentes de deficiência intelectual (DI), ocorrendo em 5% a 10% de todos os homens afetados. Mais de 100 genes seriam determinantes de DILX, porém mesmo com o conhecimento do papel de vários deles, há aspectos a serem elucidados, como a contribuição de cada um na determinação da DI ou ainda as correlações genótipo-fenótipo, cuja análise depende da investigação molecular em indivíduos com DI dita idiopática. O objetivo do presente estudo foi caracterizar variações patogênicas no número de cópias do genoma humano (CNVs) em uma amostra de indivíduos do sexo masculino com deficiência intelectual ligada ao X. Quatro deles (P1 a P4) foram selecionados para análise molecular pelo método *array Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH), que identificou uma duplicação de 0,4 Mb na região Xp11.22 no paciente P1, envolvendo cinco genes sabidamente relacionados a DI, com destaque para o *IQSEC2*, associado a DILX e características adicionais, entre as quais convulsões, atraso de fala e alterações de comportamento, observadas nesse indivíduo. Já no paciente P2 foi identificada deleção de 16,4 Mb na região Xq21.1q21.3, envolvendo seis genes relacionados a fenótipos patológicos, sendo o gene *BRWD3* considerado o responsável pela DI, atraso de fala, macrocefalia, distúrbios comportamentais e dismorfismos faciais apresentados pelo paciente. O paciente P3 apresentou duplicação de 1,4 Mb na região Xq26.2 incluindo o gene *GPC3*, associado a DI, atraso de fala, baixa estatura, hipotonia, ptose bilateral e orelhas de implantação baixa, entre outros dismorfismos faciais, descritos na síndrome de Duplicação Xq25q26. Por fim, no paciente P4, foi detectada uma duplicação de 0,9 Mb na região Xq28, que compreende um *cluster* de genes associados à DI e vem sendo considerada a região mais frequentemente alterada em indivíduos com DILX. No intervalo duplicado, o *MECP2* é apontado como o principal gene sensível à dosagem da região Xq28, porém a expressão aumentada dos genes *FLNA* e *GDI1* também foi relacionada ao fenótipo do paciente P4, caracterizado por DI, atraso de fala, dismorfismos faciais, microcefalia e refluxo gastroesofágico. Os resultados deste estudo reiteram a relevância da análise molecular do cromossomo X na investigação etiológica da DI.

Palavras-chave: Deficiência intelectual. Cromossomo X. Variações do número de cópias de DNA. Hibridização genômica comparativa.

ABSTRACT

X-linked intellectual disability (XLID) is one of the most frequent genetic causes of intellectual disability (ID), occurring in 5-10% of all affected men. Although about 100 genes have been considered as determinant of XLID, the role of most of them on the condition phenotypes remains yet to be elucidated, despite the knowledge on the biological function of several of each one. For instance, the contribution of each gene in determining the ID and the genotype-phenotype correlation depends on the genetic investigation of affected individuals. The aim of this study was to characterize pathogenic *Copy Number Variations* (CNVs) in a sample of male individuals with X-linked intellectual disability. Four out of them (P1 to P4) were selected for molecular analysis using the *array* Comparative Genomic Hybridization (*array*-CGH) that revealed a 0.4 Mb increase in the Xp11.22 region of patient P1, involving five known ID genes, including the *IQSEC2* which is associated with XLID and additional features, such as those presented by the patient, including seizures, speech delay and behavioural disorders. In patient P2, a deletion of 16.4 Mb was identified in the Xq21.1q21.3 region, encompassing six genes previously related to pathological phenotypes, being the *BRWD3* gene considered responsible for the ID, speech delay, macrocephaly, behavioural disorders and facial dysmorphisms observed in the patient. Patient P3 showed a duplication of 1.4 Mb in the Xq26.2 region involving the *GPC3* gene, associated with ID, speech delay, short stature, hypotonia, bilateral ptosis and low-set ears among other distinct facial dysmorphisms, described in the Xq25q26 Duplication syndrome identified in this patient. Finally, in patient P4, a duplication of 0.9 Mb was detected in the Xq28 region, which involves a cluster of known ID genes and it is considered to be the most frequently affected region in individuals with XLID. *MECP2* is indicated as the main dose-sensitive gene in the Xq28 region, within the duplicate interval, however, the increased expression of *FLNA* and *GDII* genes was also related to the patient P4 phenotype characterized by ID, speech delay, facial dysmorphisms, microcephaly and gastroesophageal reflux. These results highlight the importance of the X-chromosome molecular analysis in the etiological investigation of ID.

Keywords: Intellectual disability. X-chromosome. DNA copy number variations. Comparative genomic hybridization.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Arf6** proteína *ADP-ribosylation factor 6*
- array-CGH** *array Comparative Genomic Hybridization* (Hibridização Genômica Comparativa baseada em plataforma array)
- ATP** *Adenosine TriPhosphate* (Adenosina Trifosfato)
- CAAE** Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CBMEG** Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
- CEP** Comitê de Ética em Pesquisa
- CGG** Citosina–Guanina–Guanina
- cm** centímetros
- CNVs** *Copy Number Variations* (Variações em número de cópias)
- DECIPHER** *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (Banco de dados de desequilíbrio cromossômico e fenótipo em humanos usando recursos Ensembl)
- DGM** Departamento de Genética Médica
- DI** Deficiência Intelectual
- DILX** Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X
- DNAm** *Mitochondrial DNA* (DNA mitocondrial)
- EDTA** Ácido Etilenodiaminotetracético
- FCM** Faculdade de Ciências Médicas
- FMRP** proteína *Fragile-X mental retardation*
- GEF** *Guanine nucleotide Exchange Factor* (Fator de troca de nucleotídeos Guanina)
- GDP** *Guanosine Diphosphate* (Guanosina Difosfato)
- GPI** glicosilfosfatidilinositol
- GTP** *Guanosine Triphosphate* (Guanosina Trifosfato)
- HC** Hospital de Clínicas
- Huwe1** proteína *HECT, UBA and WWE domain containing 1*
- HSD10** proteína *17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10*
- IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IOP** insuficiência ovariana prematura
- Iqsec2** proteína *IQ motif-and Sec7 domain-containing 2*

ISCA *International Standards for Cytogenomic arrays* (Padrões Internacionais para arrays Citogenômicos)

JAK/STAT *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (Janus tirosina-quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição)

kb kilobases

LCRs *Low-copy-repeats* (Repetições de baixa cópia)

Mb Megabases

Mecp2 proteína *Methyl CpG binding 2*

mL mililitros

MLPA *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação)

MRX97 *X-Linked Mental Retardation 97* (DILX 97)

NCBI *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

NGS *Next-Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

np braço curto do cromossomo *n*

nq braço longo do cromossomo *n*

OMIM *Online Mendelian Inheritance in Man*

OMS Organização Mundial de Saúde

pb pares de base

PHF8 proteína *PHD finger 8*

QI Quociente Intelectual

qPCR *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real)

RNA *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNA_m *Messenger RNA* (RNA mitocondrial)

RNA_r *Ribosomal RNA* (RNA ribossômico)

SSGB síndrome de Simpson-Golabi-Behmel

SXF síndrome do X-frágil

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNICAMP Universidade Estadual de Campinas

UTI Unidade de Terapia Utensiva

UTR *Untranslated Region* (Região não traduzida)

WES *Whole Exome Sequencing* (Sequenciamento Completo do Exoma)

LISTA DE GENES

ABCD1 ATP-binding cassette, subfamily d, member 1
ACSL4 Acyl-CoA syntetase long-chain family member 4
AFF2 (FMR2) Fragile X mental retardation 2
AGTR2 Angiotensin II receptor, type 2
ALG13 UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit
AP1S2 Adaptor-related protein complex 1 sigma 2 subunit
ARHGEF6 Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6
ARX Aristaless related homeobox
ATP6AP1 ATPase, H⁺ transporting, lysosomal, accessory protein 1
ATRX Transcriptional regulator ATRX
AVPR2 Arginine vasopressin receptor 2
BCAP31 B-cell receptor-associated protein 31
BRWD3 Bromo domain and WD repeat domain-containing protein 3
CDK16 Cyclin-dependent kinase 16
CDKL5 Cyclin-dependent kinase-like 5
CHM CHM gene
CLCN4 Chloride channel 4
CNKSR2 Connector enhancer of kinase supressor of RAS 2
CXORF56 Chromosome x open reading frame 56
DCX Doublecortin
DDX3X Dead-box helicase 3, X-linked
DIAPH2 Diaphanous, drosophila, homolog of, 2
DLG3 Synapse-associated protein 102
DMD Dystrophin
EFHC2 EF-hand domain containing 2
EFNB1 Ephrin B1
EMD Emerin
FGD1 Faciogenital dysplasia protein
FLNA Filamin A
FMR1 Fragile-X mental retardation 1
FRMPD4 Ferm and Pd_z domains-containing protein 4

FTSJ1 *FtsJ homolog 1*
G6PD *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*
GDI1 *GDP dissociation inhibitor 1*
GPC3 *Glypican 3*
GPC4 *Glypican 4*
GRIA3 *Glutamate receptor, Ionotropic, AMPA 3*
GRIPAP1 *Grip1-associated protein 1*
HCFC1 *Host Cell Factor C1*
HCFC1 *Host cell factor C1*
HSD17B10 *17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10*
HUWE1 *HECT, UBA and WWE domain containing 1*
IKBK *(NEMO) Inhibitor of nuclear factor Kappa B kinase subunit gamma*
IL1RAPL1 *Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1*
IQSEC2 *IQ motif-and Sec7 domain-containing protein 2*
IRAK1 *Interleukin 1 receptor-associated kinase 1*
KDM5C *(JARID1C) Lysine-specific demethylase 5C*
KIAA2022 *Neurite extension and migration factor; NEXMIF*
KIF4A *Kinesin family member 4A*
KLF8 *Kruppel-like factor 8*
KLHL15 *Kelch-like 15*
LICAM *L1 cell adhesion molecule*
LAGE3 *L antigen family, member 3*
LAS1L *Las1-like ribosome biogenesis factor*
MAGT1 *Magnesium transporter 1*
MECP2 *Methyl CpG binding protein 2*
MED12 *Mediator complex subunit 12*
MID2 *Midline 2*
MOSPD1 *Motile sperm domain-containing protein 1*
NAA10 *N-alpha-acetyltransferase 10, non catalytic subunit*
NDUFA1 *NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 1*
NLGN3 *Neurologin 3*
NLGN4 *X-linked neurologin 4*
OGT *O-linked N-acetylglucosamine transferase*
OPHN1 *Oligophrenin 1*

OPN1LW *Opsin 1, long-wave-sensitive*
OPN1MW *Opsin 1, medium-wave-sensitive*
PAK3 *P21-activated kinase 3*
PLXNA3 *Plexin A3*
POF1B *POF1B gene*
POU3F4 *Pou domain, class 3, transcription factor 4*
RAB39B *Member RAS oncogene family*
RLIM *Ring finger protein, LIM domain interacting*
RPL10 *Ribosomal protein l10*
RPS6KA3 *Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3*
SLC16A2 *Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporter), member 2*
SLC25A5 *Solute carrier family 25 member 5*
SLC6A8 *Solute carrier family 6 member 8*
SLC9A6 *Solute carrier family 9, Member 6*
SLC9A7 *Solute carrier family 9, member 7*
SMC1A *Structural maintenance of chromosomes 1A*
SRPX2 *Sushi repeat containing protein, X-linked 2*
SSR4 *Signal sequence receptor, delta*
SYN1 *Synapsin I*
SYP *Synaptophysin*
TAF1 *Taf1 RNA polymerase II, TATA box-binding protein-associated factor*
TAZ *Tafazzin*
THOC2 *THO complex 2*
TM4SF2 *(TSPAN7) Tetraspanin 7; Transmembrane 4 superfamily, member 2*
UPF3B *UPF3 Regulator of nonsense transcripts homolog B*
USP27X *Ubiquitin-specific protease 27*
USP9X *Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked*
ZDHHC15 *Zinc finger DHHC-type containing 15*
ZNF41 *Zinc finger protein 41*
ZNF674 *Zinc finger protein 674*
ZNF711 *Zinc finger protein 711*
ZNF711 *Zinc finger protein 711*
ZNF81 *Zinc finger protein 81*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítio frágil localizado em Xq27.3	23
Figura 2. Ideograma do cromossomo X com as posições dos genes associados à DILX inespecífica	28
Figura 3. Seleção de indivíduos do presente estudo.....	35
Figura 4. Hidridização Genômica Comparativa em <i>arrays</i> (array-CGH)	37
Figura 5. Mapeamento da região Xp11.22 com destaque para os genes duplicados no paciente P1.....	40
Figura 6. Representação esquemática de duplicações de Xp11.22 envolvendo o gene <i>IQSEC2</i> em pacientes com DI. (A) Duplicação de 0.4 Mb detectada no paciente P1. (B) Duplicações sobrepostas identificadas em pacientes reportados na literatura	41
Figura 7. Mapeamento da região Xq21.1q21.3 com destaque para os genes deletados no paciente P2.....	47
Figura 8. Mapeamento da região Xq26.2 com destaque para os genes duplicados no paciente P3.....	54
Figura 9. Mapeamento da região Xq28 com destaque para os genes duplicados no paciente P4.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Genes envolvidos na DILX inespecífica, seus produtos proteicos e funções, e classificação de acordo com o tipo de variantes relatadas.....	29
Tabela II. Genes investigados pelo <i>kit</i> SALSA MLPA P106 MRX probemix	36
Tabela III. Detalhes clínicos de indivíduos do sexo masculino com duplicações de Xp11.22 envolvendo o gene <i>IQSEC2</i>	44
Tabela IV. Características fenotípicas frequentes em indivíduos do sexo masculino com variantes no gene <i>BRWD3</i>	51
Tabela V. Detalhes clínicos de indivíduos do sexo masculino com síndrome de Duplicação Xq25q26	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Fatores genéticos da deficiência intelectual.....	20
1.2. Deficiência intelectual ligada ao X (DILX).....	21
1.2.1. A síndrome do X-frágil (SXF)	22
1.2.2. Identificação de genes e investigação genética da DILX	24
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
3.1. Seleção da amostra.....	35
3.2. Rastreamento de CNVs.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Paciente P1	39
4.2. Paciente P2.....	46
4.3. Paciente P3.....	53
4.4. Paciente P4.....	59
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. ANEXOS.....	96
7.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	96
7.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	101

1. INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI), isolada ou associada a anomalias congênitas, é identificada pela redução substancial das funções intelectuais, concomitante a déficits do comportamento adaptativo, com limitações em habilidades conceituais, sociais e práticas, originando-se antes dos 18 anos de idade, durante o período de desenvolvimento (American Psychiatric Association, 2013; Long *et al.*, 2016; Vissers, Gilissen & Vetlman, 2016).

De acordo com o quociente intelectual (QI), a DI pode ser classificada em leve (QI na faixa de 50-69), moderada (QI na faixa de 35-49), grave (QI na faixa de 20-34) e profunda (QI inferior a 20), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). A confirmação costuma ser tardia, porém a suspeita diagnóstica pode surgir antes dos cinco anos de idade, com a observação de atraso do desenvolvimento neuromotor (Mefford, Batshaw & Hoffman, 2012; American Psychiatric Association, 2013; Moeschler *et al.*, 2014). Como não há possibilidade de validar testes psicométricos para a determinação do QI antes de cinco anos de vida, para as crianças nessa faixa etária que não atingirem os marcos do desenvolvimento neuropsicomotor esperados para a idade, é utilizada a designação de atraso global do desenvolvimento, que poderá resultar em déficit intelectual no futuro (Schalock *et al.*, 2010; Moeschler *et al.*, 2014).

A DI representa uma das categorias mais amplas de distúrbios, acometendo de 1% a 3% da população geral (Honda *et al.*, 2010; Bassani *et al.*, 2013; Madrigal *et al.*, 2016). Nos países em desenvolvimento, porém, estima-se prevalência até três vezes maior, fato atribuído ao efeito de fatores ambientais adversos, como desnutrição proteico-calórica, infecções do sistema nervoso central, além de registrarem maior frequência de casamentos consanguíneos e carência de serviços de aconselhamento genético (Chiurazzi & Oostra, 2000; Leonard & Wen, 2002; Johnson *et al.*, 2006; Schalock, 2011).

É considerada problema de saúde pública por sua prevalência e consequências negativas para a produtividade e relações sociais, além do aumento na demanda por serviços médicos e educacionais especializados (Chiurazzi, Hamel & Neri, 2001; Battaglia & Carey, 2003; Ropers & Hamel, 2005). No Brasil, conforme dados do Censo Demográfico (2010), há mais de 45 milhões de pessoas com pelo menos uma forma de deficiência (física ou intelectual), o que representa aproximadamente 23% da

população. Dentre esses, pelo menos 2,6 milhões ou 1,4% seriam deficientes intelectuais, o que deve corresponder a subestimativas tendo em vista os índices propostos para países em desenvolvimento (IBGE, 2010).

Devido à significativa heterogeneidade causal e fenotípica dessa condição, um dos grandes desafios é a determinação de sua etiologia, que permanece desconhecida em cerca de 60% dos casos (Ropers, 2008; Topper, Ober & Das, 2011; Ellison, Rosenfield & Shaffer, 2013; Moeschler *et al.*, 2014; Srouf & Shevell, 2014). Embora fatores ambientais sejam comumente associados à DI, com destaque para alguns teratógenos como álcool e drogas, infecções maternas como rubéola, toxoplasmose e sífilis, além de complicações peri e (ou) neonatais (García-Carzola *et al.*, 2009; Ellison, Rosenfeld & Shaffer, 2013; Chiurazzi & Pirozzi, 2016; Vissers, Gilissen & Vetlman, 2016), uma parcela significativa é atribuída a causas genéticas, incluindo desde anomalias cromossômicas a variações de ponto, ou ainda fatores epigenéticos, em especial entre as formas mais graves. Estima-se que 25% a 50% do atraso global do desenvolvimento e da DI (moderada a profunda) tem origem genética (Wu *et al.*, 2010), sendo já estimado que cerca de 750 genes humanos conhecidos seriam causadores deste distúrbio (Kochinke *et al.*, 2016).

1.1. Fatores genéticos da deficiência intelectual

Entre as causas genéticas de DI destacam-se as cromossomopatias, em particular a síndrome de Down entre as aneuploidias (Thompson & Thompson, 2008), bem como alterações estruturais envolvendo milhões de pares de base (pb) ou regiões submicroscópicas, como as chamadas variações no número de cópias do genoma humano (*Copy Number Variations*, CNVs); sequências de DNA de 1 kilobases (kb) ou mais, nas quais há divergência no número de cópias entre indivíduos (Feero, Gutmacher & Collins, 2002; Sebat *et al.*, 2004; Sharp, 2009), sendo classificadas como deleções, duplicações, repetições invertidas ou mesmo *hotspots* de rearranjo cromossômico, entre outras (Redon *et al.*, 2006; Scherer *et al.*, 2007; Conrad *et al.*, 2010). Além disso, mecanismos como dissomia uniparental e fatores epigenéticos, como erros na impressão genômica ou *imprinting*, também são descritos, por exemplo, em um percentual dos indivíduos com as síndromes de Angelman e Prader-Willi (Borelina *et al.*, 2004; Raymond & Tarpey, 2006; Thompson & Thompson, 2008).

Numerosos erros metabólicos se relacionam ao atraso global do desenvolvimento, assim como uma parcela considerável das síndromes monogênicas se relacionam à DI em graus variados (Topper, Ober & Das, 2011; Mefford, Barshaw & Hoffman, 2012). Contudo, boa parte dos estudos relacionados às heredopatias mendelianas tem como foco a identificação de genes do cromossomo X ou grupo da deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (DILX), pela peculiaridade de sua transmissão, que em geral possibilita a análise simultânea de vários indivíduos afetados, distribuídos em diferentes gerações das respectivas genealogias. Nesse grupo, destaca-se a síndrome do X-frágil (SXF), principal causa monogênica de DI, bem como inúmeras outras condições que se associam ou tem a DI como manifestação principal e são determinadas por genes do cromossomo X (Stoeva *et al.*, 2008; Des Portes, 2013; Kidd *et al.*, 2014; Suhl & Warren, 2015).

1.2. Deficiência intelectual ligada ao X (DILX)

Em 1972, Lehrke já relatava a provável influência de genes do cromossomo X na inteligência humana. A observação de que esses genes exercem uma maior expressão no cérebro de mamíferos que os genes autossômicos reforça a hipótese que genes importantes para o funcionamento cerebral concentraram-se no cromossomo X ao longo da evolução (Turner & Pardington, 1991; Zechner *et al.*, 2001; Graves, Géczy & Hameister, 2002; Nguyen & Disteche, 2006), sendo uma das razões pelas quais a investigação do atraso global do desenvolvimento ou da DI ter se voltado preferencialmente a esse cromossomo (Whibley *et al.*, 2010; Gijssbers *et al.*, 2011; Piton, Redin & Mandel, 2013; Kalscheuer *et al.*, 2016).

O cromossomo X possui cerca de 156 milhões de pb e 1.593 genes, correspondendo a cerca de 5% dos genes do genoma humano (Kaufman, Ayub & Vincent, 2010; Neri *et al.*, 2018). Aproximadamente, 830 genes já foram identificados como codificadores de proteínas (*Ensembl Genome Browser*, 2019), cujas funções se relacionam principalmente à regulação da transcrição de outros genes, à transdução de sinais e ao metabolismo celular (Chiurazzi *et al.*, 2008; Kramer & van Bokhoven, 2009).

Devido à grande quantidade de genes do cromossomo X envolvida no desenvolvimento intelectual, é plausível supor que alterações nos mesmos resultem em prejuízo cognitivo (Chelly *et al.*, 2006; Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012). Outra

possibilidade é a de que polimorfismos nesse cromossomo teriam efeitos sutis sobre as habilidades cognitivas na maioria dos portadores, mas resultariam em DI pela predisposição recorrente de combinações genéticas (entre certos alelos ligados ao X ou autossômicos) ou pelo efeito de fatores ambientais (Mandel & Chelly, 2004).

A DILX é uma das causas genéticas mais frequentes de DI e ocorre em cerca de 5% a 10% de todos os homens afetados (Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012; Basit *et al.*, 2016; Orivoli *et al.*, 2016). É convencionalmente classificada em *sindrômica* e *não* *sindrômica* ou *inespecífica*, sendo considerada DI *sindrômica* àquela associada a anomalias congênitas e distúrbios diversos, e *inespecífica* quando a DI é a única manifestação clínica consistente (Chiurazzi *et al.*, 2008). No entanto, apesar da distinção, alterações em vários genes associados à DILX foram encontradas para ambas as formas, e genes inicialmente associados a condições inespecíficas podem estar sujeitos à reclassificação após revisão clínica de dados moleculares (Kleefstra & Hamel, 2005; Ropers, 2006; Madrigal *et al.*, 2007a; Tarpey *et al.*, 2007; Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012).

1.2.1. A síndrome do X-frágil (SXF)

A síndrome do X-frágil (SXF, OMIM #300624) se destaca entre as numerosas condições classificadas como DILX *sindrômica*, por ser a principal causa hereditária e a segunda fonte genética de DI, superada apenas pela síndrome de Down (Gardner & Sutherland, 2004; Yim *et al.*, 2008) e ocorrendo em aproximadamente 1:4.000 a 1:6.000 homens (Coffee *et al.*, 2009; Huddleston, Visootsak & Sherman, 2014). A denominação “X-frágil” se refere a uma região onde a cromatina não se condensa apropriadamente durante a mitose, sujeita a quebras ou falhas, ou seja, um “sítio frágil”, situado em Xq27.3 (Figura 1) (Thompson & Thompson, 2008).

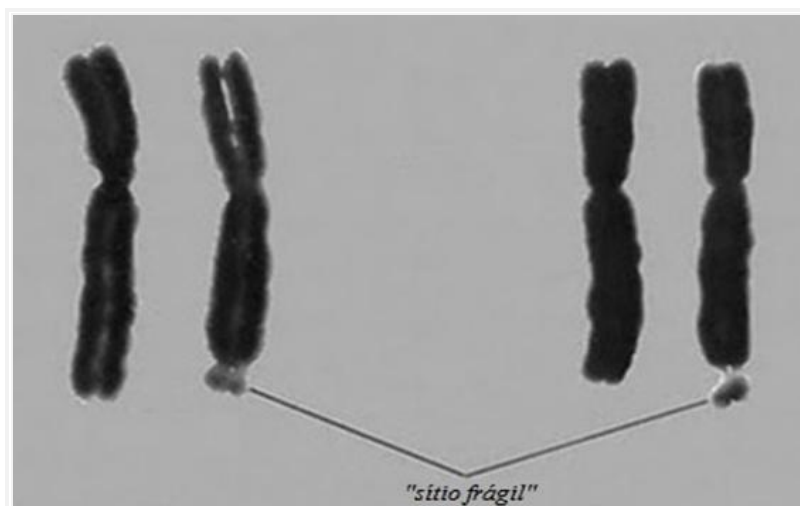


Figura 1. Sítio frágil localizado em Xq27.3 (adaptado de <https://www.britannica.com/science/fragile-X-syndrome>, acesso em 10/05/2019).

A causa primária da SXF é uma variante caracterizada pela expansão de uma sequência de trinucleotídeos CGG, na região 5' não-traduzida (UTR) do primeiro éxon do gene *Fragile-X Mental Retardation 1* (*FMRI*, OMIM 309550) (Verkerk *et al.*, 1991; Gallagher & Hallahan, 2012; Huddleston, Visootsak & Sherman, 2014). O número normal de repetições varia de 6 a 50, enquanto indivíduos com 50 a 200 cópias são denominados portadores da pré-mutação. Os pacientes com SXF apresentam centenas de repetições, em geral acima de 200 até 2.000, determinando a mutação completa; mais de 200 cópias da repetição levam a uma metilação excessiva de citosinas no promotor do *FMRI*, uma forma de modificação do DNA que impede o funcionamento normal e silencia o gene (Hammond *et al.*, 1997; De Vries, 1998; Jorde, 2004; Thompson & Thompson, 2008; Nagamani *et al.*, 2012).

A deficiência funcional da proteína codificada pelo gene *FMRI*, denominada *FMRP*, é vinculada ao fenótipo da SXF, que inclui, além de DI (em geral, de moderada a grave no sexo masculino), distúrbios de linguagem e comportamento, inclusive com características de transtorno do espectro autista. Também são comuns dismorfismos craniofaciais, como face alongada e mandíbula proeminente, orelhas grandes e (ou) em abano, e macroorquidia, comumente observados a partir da puberdade (De Vries, 1998; Jorde, 2004; Gallagher & Hallahan, 2012).

As repetições de trinucleotídeos CGG tendem a aumentar na gametogênese feminina, de geração para geração, podendo continuar como pré-mutação ou transformar-se em mutação completa (Nolin *et al.*, 2003; Coffee *et al.*, 2009). Já na gametogênese masculina, não há expansão de pré-mutação a mutação, assim, as filhas

de homens pré-mutados não manifestam a SXF. Em contrapartida, a expansão mitótica da repetição de CGG é maior nos homens e, por esse motivo, os filhos de mulheres transmissoras possuem expansões maiores que os das filhas (Pouya *et al.*, 2009). Frequência, quadro clínico, além de peculiaridades de transmissão e mecanismo genético, justificam o destaque da SXF no grupo da DILX.

1.2.2. Identificação de genes e investigação genética da DILX

De um modo geral, a identificação de genes permite melhor compreensão do papel fisiológico das vias metabólicas e de doenças subjacentes contribuindo para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas (Antonarakis & Beckmann, 2006, Gilissen *et al.*, 2012; Vissers, Gilissen & Vetlman, 2016). Ao longo dos últimos anos, houve um aumento contínuo na identificação de genes relacionados à DILX (Chiurazzi *et al.*, 2008; Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012; Kalscheuer *et al.*, 2016; Neri *et al.*, 2018).

A abordagem mais utilizada e que permitiu a identificação da maioria dos genes relacionados à DILX foi o estudo de ligação a partir de marcadores moleculares, com análise subsequente de genes candidatos (Kaufman, Ayub & Vincent, 2010; Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012; Neri *et al.*, 2018). Grande parte do processo de reconhecimento foi facilitada pelo padrão de herança característico e pela disponibilidade de genealogias para a análise de ligação (Ropers & Hamel, 2005; Rejeb, Jemaa & Chaabouni, 2009), bem como a colaboração de consórcios internacionais (Ropers, 2010).

Outros genes foram relacionados a DI devido à crescente capacidade para executar análises de genótipos a partir de *microarrays* (Lugtenberg, Veltman & van Bokhoven, 2007; Carreira *et al.*, 2015; Neri *et al.*, 2018). Com o aumento da disponibilidade e da sensibilidade de tal tecnologia, CNVs patogênicas têm sido observadas em 10% a 15% (Vissers *et al.*, 2003; Schoumans *et al.*, 2005; Zahir & Friedman, 2007; Koolen *et al.*, 2009; McMullan *et al.*, 2009; Nicholl *et al.*, 2014) e em até 24% (Shaw-Smith *et al.*, 2004) dos indivíduos com DI.

Deleções e duplicações aparentemente patogênicas maiores que 100 kb foram identificadas em cerca de 5% das famílias catalogadas no Consórcio Europeu de Deficiência Intelectual Ligada ao X (*European XLID Consortium*), sendo mais comum a duplicação do gene *MECP2* (Lugtenberg, Veltman & van Bokhoven, 2007). Whibley

et al. (2010) detectaram CNVs patogênicas no cromossomo X em aproximadamente 10% das 251 famílias em que a DI segregava com padrão sugestivo de herança ligada a esse cromossomo, reforçando a hipótese de que rearranjos em X explicam parte dos casos de DI. No entanto, apesar de extensos estudos genéticos de análise convencional a partir de genes candidatos ou mesmo análise de CNVs, a causa subjacente à DI se mantém incerta para um número significativo das famílias estudadas (Kalscheuer *et al.*, 2016).

A investigação das causas moleculares da DILX inespecífica é particularmente complexa pela significativa heterogeneidade genética, que limita o compartilhamento de informações entre famílias não relacionadas, dificultando a busca por variantes (Ropers & Hamel, 2005; Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012). Recentemente, a implantação das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento ou de nova geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS) tem sido um fator importante na detecção de variantes raras e genes determinantes da DI (Niranjan *et al.*, 2015; Tzschach *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016; Vissers, Gilissen & Veltman, 2016; Neri *et al.*, 2018).

O sequenciamento completo do exoma (*Whole Exome Sequencing*, WES) consiste na determinação das bases nitrogenadas do DNA direcionada às sequências genômicas responsáveis por codificar proteínas (éxons) em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única reação. As chamadas regiões codificantes representam menos de 2% de todo o genoma humano, porém variações nessas regiões são responsáveis por aproximadamente 85% das doenças genéticas com padrão mendeliano (Majewski *et al.*, 2011; Gilissen *et al.*, 2012; Ku *et al.*, 2012; Polychronakos & Ku, 2013). É considerado particularmente eficaz na pesquisa de indivíduos com manifestação atípica de um determinado distúrbio ou para condições que apresentem significativa heterogeneidade genética e (ou) fenotípica, como é o caso da DI (Bamshad *et al.*, 2011; Majewski *et al.*, 2011; Helsmoortel *et al.*, 2014). Frente a essa perspectiva, diversos estudos analisaram sua viabilidade na investigação das causas da deficiência intelectual.

De Ligt *et al.* (2012) avaliaram 100 pacientes com DI detectando variações consideradas causais e obtendo o diagnóstico etiológico em 16% da amostra pela análise do exoma. Já Helsmoortel *et al.* (2014) investigaram dez pacientes com DI inespecífica constatando variantes distintas em 30%, enquanto Hamdam *et al.* (2014) observaram variantes novas em 29% dos indivíduos de sua amostra, relacionadas a genes sabidamente envolvidos com a DI. No estudo de Halvardson *et al.* (2016) a análise de

WES levou à elucidação molecular em 28% das famílias estudadas. Por outro lado, Anazi *et al.* (2017), ao avaliar pacientes com DI e resultado de *microarray* dentro da normalidade, tiveram uma resolução diagnóstica de 60%, além de identificarem possíveis variantes patogênicas em três genes candidatos. As variações na frequência de resolução etiológica da DI podem ser atribuídas a diferenças no critério de seleção dos pacientes, na interpretação das alterações detectadas e na qualidade da abordagem de sequenciamento (Vissers, Gilissen & Vetlman, 2016).

As chamadas alterações *de novo* (não herdadas) representam uma importante causa de DI (Topper, Ober & Das, 2011; De Ligt *et al.*, 2012; Gilissen *et al.*, 2014). Em estudo piloto de sequenciamento completo do exoma, Vissers *et al.* (2010) aplicaram o método pela primeira vez no estudo de pacientes com DI e seus pais não afetados. Este sequenciamento à base de trio (pais e paciente) permitiu a identificação de variantes potencialmente patogênicas *de novo* em dois genes conhecidos e em quatro genes candidatos, determinando a origem genética da DI em 60% dos pacientes, classificada até então como de causa indeterminada.

A análise em trio tornou-se rapidamente um mecanismo útil na identificação de alterações *de novo* associadas à DI e distúrbios do desenvolvimento neurológico de início precoce (Veltman & Brunner, 2012; Epi *et al.*, 2013; Fromer *et al.*, 2014). Além disso, nos casos em que os resultados por sequenciamento não são conclusivos na identificação do gene causador e (ou) quando há apenas um indivíduo afetado na família, tal estratégia pode contribuir no estabelecimento da variante genética causal, a partir da exclusão de alterações compartilhadas com os pais (Majewski *et al.*, 2011; Biesecker & Green, 2014; Chiurazzi & Pirozzi, 2016).

No âmbito da DILX, aplicações bem sucedidas do método WES concentradas na investigação de possíveis variantes gênicas associadas (Tarpey *et al.*, 2009; Nava *et al.*, 2012; Moncini *et al.*, 2013; Piton, Redin & Mandel, 2013; Philips *et al.*, 2014; Kuroda *et al.*, 2015; Niranjan *et al.*, 2015; Thevenon *et al.*, 2015; Tzschach *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016; Kalscheuer *et al.*, 2016; Madrigal *et al.*, 2016) demonstram que a relação entre essas alterações e a DILX é relatada com frequência, contribuindo para a compreensão global dos mecanismos genéticos desse distúrbio.

Entre os mais promissores, Hu *et al.* (2016) analisaram uma grande coorte de famílias com DILX de causa indeterminada demonstrando que 20% apresentaram variantes patogênicas em genes já conhecidos como causadores de DI, além de descreverem sete genes novos (*CLCN4*, *CNKS2*, *FRMPD4*, *KLHL15*, *LAS1L*,

RLIM e *USP27X*) e dois candidatos (*CDK16* e *TAF1*). Outra estratégia, conhecida como “*Affected Kindred/Cross-Cohort Analysis*”, também identificou variantes em genes já associados à DILX e em genes novos, incluindo *PLXNA3*, *GRIPAP1*, *EFNB* e *OGT* (Niranjan *et al.*, 2015).

A aplicação das diversas tecnologias genômicas possibilitou a identificação de mais de 100 genes associados à DI como *AFF2*, *ARX*, *ATRX*, *CNKS2R2*, *DCX*, *DMD*, *FMR1*, *IL1RAPL1*, *KDMC5*, *MECP2*, *OPHN1*, *PAK3* e ainda os genes *ARHGEF9*, *SLC9A6* e *HUWE1*, de descrição mais recente (Chiurazzi *et al.*, 2008; Géczy, Shoubridge & Corbett 2009; Kaufman, Ayub & Vincent, 2010; Quillé *et al.*, 2011; Houge, Rasmussen & Hovland, 2012; Lubs, Stevenson & Schwartz, 2012; Ellison, Rosenfeld & Shaffer, 2013; Tzschach *et al.*, 2015; Madrigal *et al.*, 2016; Neri *et al.*, 2018), muitos dos quais vêm sendo utilizados em painéis de triagem na rotina de investigação da DI (Piton, Redin & Mandel, 2013; Basehore *et al.* 2015).

Estima-se que até 80% dos genes associados a DI inespecífica estejam situados no cromossomo X (Kaufman, Ayub & Vincent, 2010) e, até a última revisão deste estudo, aproximadamente 57 genes já foram identificados como causadores desse distúrbio (Figura 2; Tabela I). De Brouwer *et al.* (2007), avaliando 600 famílias provenientes do banco de genealogias do Consórcio Europeu de DILX, verificaram que 17% das que registravam mais de um indivíduo afetado em apenas uma irmandade tiveram a DI esclarecida a partir da identificação de variantes patogênicas em genes do cromossomo X. Os autores estimaram que, além do *FMR1*, os genes mais frequentemente alterados são *ARX*, *MECP2*, *PQBPI* e *SLC6A8*, contribuindo para 1,4% dos casos isolados de DI em indivíduos do sexo masculino e até 20% dos casos familiares de DILX.

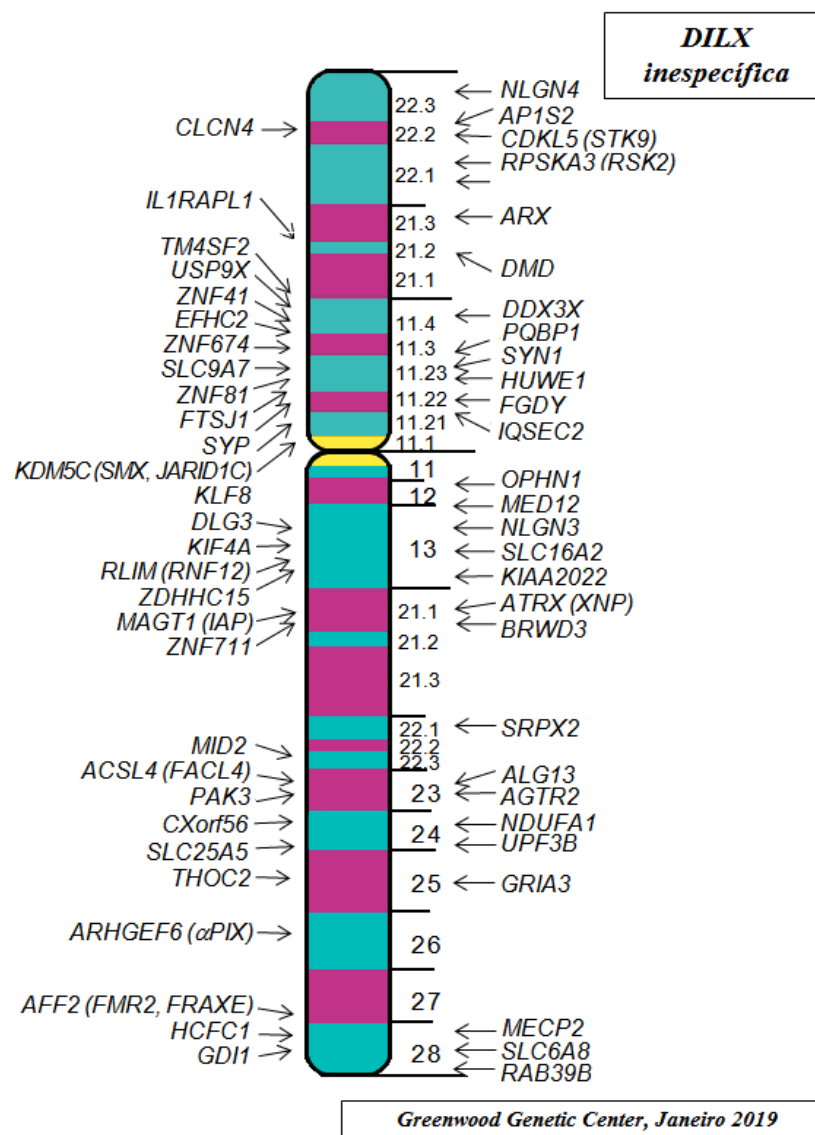


Figura 2. Ideograma do cromossomo X com as posições dos genes associados à DILX inespecífica (adaptado de <https://www.ggc.org/xlid-genetic-research>, acesso em 10/05/2019).

Tabela I. Genes envolvidos na DILX inespecífica, seus produtos proteicos e funções, e classificação de acordo com os tipos de variantes relacionadas.

Símbolo do Gene	Banda Citogenética	OMIM	Produto Proteico	Função	Tipo de Variantes	Referências
<i>ACSL4</i> ⁺ (<i>FACL4</i>)	Xq22.3	300157	<i>Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i>	Metabolismo de ácidos graxos	<i>Missense</i> ; Sítio de <i>splicing</i>	Meloni <i>et al.</i> , 2002; Watkins <i>et al.</i> , 2007
<i>AFF2</i> (<i>FMR2</i>) ⁺	Xq28	300806	<i>Fragile X mental retardation 2</i>	Proteína de ligação de DNA; potencial ativador de transcrição	5' GGC repetição amplificação conduz à metilação	Géczy <i>et al.</i> , 1996; Bensaid <i>et al.</i> , 2009; Stettner <i>et al.</i> , 2011; Mondal <i>et al.</i> , 2012
<i>AGTR2</i> ⁺	Xq23	300034	<i>Angiotensin II receptor, type 2</i>	Receptor de proteína G acoplada para angiotensina II; mediadora da morte celular programada	<i>Missense</i> ; <i>Truncating</i>	Vervoort <i>et al.</i> , 2002; Piton, Redin & Mandel, 2013
<i>ALG13</i> ⁺	Xq23	300776	<i>UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit</i>	Catalisador de N-glicosilação	<i>Missense</i> ; Deleção	Timal <i>et al.</i> , 2012; Bissar-Tadmouri <i>et al.</i> , 2014; Michaud <i>et al.</i> , 2014
<i>AP1S2</i> ⁺	Xp22.2	300629	<i>Adaptor-related protein complex 1 sigma 2 subunit</i>	Complexo envolvido no recrutamento de clatrina e reconhecimento do sinal de triagem; vesículas sinápticas / liberação de neurotransmissores	<i>Truncating</i>	Tarpey <i>et al.</i> , 2006
<i>ARHGEF6</i> ⁺ (<i>aPIX</i>)	Xq26.3	300267	<i>Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6</i>	Fator de troca do nucleotídeo Guanina para Rac e Cdc42	Sítio de <i>splicing</i>	Kutsche <i>et al.</i> , 2000; Madrigal <i>et al.</i> , 2010
<i>ARX</i>	Xp21.3	300382	<i>Aristaless related homeobox</i>	Regulação transcricional durante o desenvolvimento	<i>In frame</i> inserções/deleções, <i>Missense</i>	Bienvenu <i>et al.</i> , 2002; Strømme <i>et al.</i> , 2002a, b; Thorson <i>et al.</i> , 2010
<i>ATRX</i> (<i>XNP</i>)	Xq21.1	300032	<i>Transcriptional regulator ATRX</i>	Remodelação da cromatina	<i>Missense</i>	Gibbons <i>et al.</i> , 1995; Gibbons <i>et al.</i> , 2000; Yntema <i>et al.</i> , 2002
<i>BRWD3</i> ⁺	Xq21.1	300553	<i>Bromo domain and WD repeat domain-containing protein 3</i>	Sinalização JAK/STAT em <i>Drosophila</i> ; modificador de cromatina putativo	<i>Missense</i> , <i>Frameshift</i>	Field <i>et al.</i> , 2007; Grotto <i>et al.</i> , 2014
<i>CDKL5</i> ⁺ (<i>STTK9</i>)	Xp22.13	300203	<i>Cyclin-dependent kinase-like 5</i>	Maturação neural e a sinaptogênese; quinase	<i>Truncating</i> ; Deleção; <i>Frameshift</i>	van Esch <i>et al.</i> , 2007; Russo <i>et al.</i> , 2009; Bartnik <i>et al.</i> , 2009
<i>CLCN4</i> ⁺	Xp22.2	302910	<i>Chloride channel 4</i>	Transportador de cloreto acoplado a prótons	<i>Truncating</i> ; <i>Missense</i>	Claes <i>et al.</i> , 1997; Veeramah <i>et al.</i> , 2013; Hu <i>et al.</i> , 2016
<i>CXORF56</i>	Xq24	301012	<i>Chromosome x open reading frame 56</i>	Desconhecida	<i>Frameshift</i>	Verkerk <i>et al.</i> , 2018
<i>DDX3X</i>	Xp11.4	300160	<i>Dead-box helicase 3, X-linked</i>	Helicase de RNA dependente de ATP	<i>Missense</i>	Snijders Blok <i>et al.</i> , 2015

<i>DLG3</i> ⁺	Xq13.1	300189	<i>Synapse-associated protein 102</i>	Organização e andaimes na densidade pós-sináptica; proteína da família MAGUK	<i>Truncating</i>	Tarpey <i>et al.</i> , 2004
<i>DMD</i> ⁺	Xp21.2-p21.1	300377	<i>Dystrophin</i>	Ancora matriz extracelular ao citoesqueleto via F-actina; evento de sinalização e transmissão sináptica	<i>Truncating</i> ; <i>Missense</i> ; Deleção;	Pernelle <i>et al.</i> , 1988; Boyce <i>et al.</i> , 1991; Daoud <i>et al.</i> , 2009
<i>EFHC2</i> ⁺	Xp11.3	300817	<i>EF-hand domain containing 2</i>	Expressão nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central	Deleção	Gu <i>et al.</i> , 2005; Weiss <i>et al.</i> , 2007
<i>FGD1</i>	Xp11.22	300546	<i>FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1</i>	Fator de troca do nucleotídeo Guanina para Rac e Cdc42	<i>Missense</i>	Lebel <i>et al.</i> , 2002
<i>FTSJ1</i> ⁺	Xp11.23	300499	<i>FtsJ homolog 1</i>	Processamento e modificação do RNAr	<i>Truncating</i> ; <i>Missense</i>	Freude <i>et al.</i> , 2004
<i>GDI1</i> ⁺	Xq28	300104	<i>GDP dissociation inhibitor 1</i>	Inibidor de GTPases Rab	<i>Truncating</i> ; <i>Missense</i>	D'Adamo <i>et al.</i> , 1998; Vandewalle <i>et al.</i> , 2009
<i>GRIA3</i> ⁺	Xq25	305915	<i>Glutamate receptor, Ionotropic, AMPA 3</i>	Transdução de sinal; transdução de sinal excitatória; receptor neurotransmissor excitatório	Duplicação; <i>Missense</i> ; <i>Frameshift</i> ;	Chiyonobu <i>et al.</i> , 2007; Wu <i>et al.</i> , 2007; Philips <i>et al.</i> , 2014
<i>HCFC1</i>	Xq28	300019	<i>Host Cell Factor C1</i>	Regulador transcricional associado à cromatina	<i>Missense</i> ; Duplicação	Gedeon <i>et al.</i> , 1991; Yu <i>et al.</i> , 2013; Huang <i>et al.</i> , 2012
<i>HUWE1</i> ⁺	Xp11.22	300697	<i>HECT, UBA and WWE domain containing 1</i>	Ubiquitina ligase E3; mecanismo de ubiquitinação	<i>Missense</i> ; Duplicação	Froyen <i>et al.</i> , 2008; Froyen <i>et al.</i> , 2012; Nava <i>et al.</i> , 2012
<i>ILIRAPL1</i> ⁺	Xp21.3-p21.2	300206	<i>Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1</i>	Parte da família do receptor de interleucina 1; liberação de cálcio neuronal e diferenciação dendrítica	<i>Truncating</i> ; Deleção	Carrié <i>et al.</i> , 1999; Nawara <i>et al.</i> , 2008; Franek <i>et al.</i> , 2011
<i>IQSEC2</i> ⁺	Xp11.22	300522	<i>IQ motif-and Sec7 domain-containing protein 2</i>	Organização do citoesqueleto; morfologia da coluna dendrítica; organização sináptica excitatória	<i>Missense</i> ; Duplicação; <i>Frameshift</i>	Gedeon <i>et al.</i> , 1994; Shoubbridge <i>et al.</i> , 2010; Tran Mau-Them <i>et al.</i> , 2014
<i>KDM5C (JARID1C)</i>	Xp11.22	314690	<i>Lysine-specific demethylase 5C</i>	Regulação transcricional e remodelação da cromatina	<i>Truncating</i> ; <i>Missense</i>	Jensen <i>et al.</i> , 2005
<i>KIAA2022</i> ⁺	Xq13.2	300524	<i>Neurite extension and migration factor; NEXMIF</i>	Síntese de DNA, atividade da DNA polimerase; atividade de exonuclease 3'-5'	<i>Frameshift</i> ; Duplicação; <i>Truncating</i> ;	Cantagrel <i>et al.</i> , 2004; van Maldergem <i>et al.</i> , 2013; de Lange <i>et al.</i> , 2016; Webster <i>et al.</i> , 2017
<i>KIF4A</i>	Xq13.1	300521	<i>Kinesin family member 4^a</i>	Processos celulares	<i>Missense</i> ; Deleção	Willemsen <i>et al.</i> , 2014
<i>KLF8</i>	Xp11.21	300286	<i>Kruppel-like factor 8</i>	Repressor transcricional e ativador	Duplicação; Translocação	Lossi <i>et al.</i> , 2002
<i>MAGT1</i> ⁺ (IAP)	Xq21.1	300715	<i>Magnesium transporter 1</i>	Incorporação celular de Mg ²⁺ ; transferase oligossacarídeo; N-glicosilação	<i>Missense</i>	Molinari <i>et al.</i> , 2008

<i>MECP2</i> ⁺	Xq28	300005	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>	Ligação metil para controle transcrricional	<i>Truncating; Missense; Deleção</i>	Amir <i>et al.</i> , 1999; Orrico <i>et al.</i> , 2000
<i>MED12</i> ⁺	Xq13.1	300188	<i>Mediator complex subunit 12</i>	Ativação ou repressão transcrricional	<i>Missense; Duplicação</i>	Lesca <i>et al.</i> , 2013; Bouazzi <i>et al.</i> , 2015; Tzschach <i>et al.</i> , 2015
<i>MID2</i>	Xq22.3	300204	<i>Midline 2</i>	E3 ubiquitina ligase; estabilização de microtúbulos	<i>Missense</i>	Geetha <i>et al.</i> , 2014
<i>NDUFA1</i>	Xq24	300078	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 1</i>	Metabolismo; produção de energia; atividade oxidoreductase	<i>Truncating; Deleção</i>	Fernandez-Moreira <i>et al.</i> , 2007
<i>NLGN3</i> ⁺	Xq13.1	300336	<i>Neurologin 3</i>	Interações célula-célula entre os neurônios; ligantes para a família das neurexinas	<i>Truncating</i>	Philibert <i>et al.</i> , 2000; Jamain <i>et al.</i> , 2003
<i>NLGN4</i> ⁺	Xp22.31–p22.32	300427	<i>X-linked neurologin 4</i>	Proteína de adesão	<i>Truncating</i>	Laumonnier <i>et al.</i> , 2004
<i>OPHN1</i>	Xq12	300127	<i>Oligophrenin 1</i>	Proteína de ativação da Rho-GTPase	<i>Truncating; Deleção</i>	Billuart <i>et al.</i> , 1998; Philip <i>et al.</i> , 2003; Santos-Rebouças <i>et al.</i> , 2014
<i>PAK3</i> ⁺	Xq22.3	300142	<i>p21-activated kinase 3</i>	Participa da cascata de Rho-GTPases	<i>Truncating; Missense; Sítio de splicing</i>	Allen <i>et al.</i> , 1998; Rejeb <i>et al.</i> , 2008; Hoischen <i>et al.</i> , 2009
<i>PQBP1</i>	Xp11.23	300463	<i>Polyglutamine binding protein 1</i>	Ativação transcrricional	<i>Missense</i>	Kalscheuer <i>et al.</i> , 2003; Flynn, Zou & Milunsky, 2011
<i>RAB39B</i> ⁺	Xq28	300774	<i>Member RAS oncogene family</i>	Formação e manutenção sináptica	<i>Missense; Deleção</i>	Giannandrea <i>et al.</i> , 2010; Wilson <i>et al.</i> , 2014; Mata <i>et al.</i> , 2015
<i>RLIM</i> ⁺ (<i>RNF12</i>)	Xq13.2	300379	<i>Ring finger protein, LIM Domain Interacting</i>	Co-regulador negativo dos fatores de transcrição do homeodomínio do LIM	<i>Missense</i>	Tonne <i>et al.</i> , 2015; Hu <i>et al.</i> , 2016
<i>RPS6KA3</i> ⁺ (<i>RSK2</i>)	Xp22.12	300075	<i>Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>	Ras / Map / ERK via de sinalização	<i>Missense</i>	Merienne <i>et al.</i> , 1999; Tejada <i>et al.</i> , 2011; Matsumoto <i>et al.</i> , 2013
<i>SLC16A2</i> ⁺	Xq13.2	300095	<i>Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporter), member 2</i>	Transporte de hormônio tireoidiano	<i>Truncating; Nonsense; Deleção</i>	Friesema <i>et al.</i> , 2004; Schwartz <i>et al.</i> , 2005; Maranduba <i>et al.</i> , 2006
<i>SLC25A5</i>	Xq24	300150	<i>Solute carrier family 25 Member 5</i>	Replicação e transcrição do DNAm	<i>Deleção</i>	Vandewalle <i>et al.</i> , 2013
<i>SLC6A8</i>	Xq28	300036	<i>Solute carrier family 6 member 8</i>	Transportador de creatina	<i>Truncating; Missense</i>	Salomons <i>et al.</i> , 2001; Hahn <i>et al.</i> , 2002; van de Kamp <i>et al.</i> , 2013; Yu <i>et al.</i> , 2013
<i>SLC9A7</i>	Xp11.3	300368	<i>Solute carrier family 9, member 7</i>	Manutenção da homeostase de cátions na rede trans-Golgi	<i>Missense</i>	Khayat <i>et al.</i> , 2019

<i>SRPX2</i>	Xq22.1	300642	<i>Sushi repeat containing protein, X-linked 2</i>	Transdução de sinal; fator de crescimento 2; modulação de circuitos neurais; regulação da sinaptogênese	<i>Missense</i>	Roll <i>et al.</i> , 2006
<i>SYN1</i> ⁺	Xp11.3-p11.2	313440	<i>Synapsin I</i>	Neurotransmissão sináptica; desenvolvimento neuronal; sinaptogênese; manutenção de sinapses maduras e plasticidade	<i>Truncating</i>	Garcia <i>et al.</i> , 2004; Fassio <i>et al.</i> , 2011
<i>SYP</i>	Xp11.23	313475	<i>Synaptophysin</i>	Proteínas das vesículas sinápticas	<i>Truncating; Missense</i>	Tarpey <i>et al.</i> , 2009
<i>THOC2</i> ⁺	Xq25	300395	<i>THO complex 2</i>	Transcrição ou exportação de RNAm	<i>Missense</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2015
<i>TM4SF2 (TSPAN7)</i> ⁺	Xp11.4	300096	<i>Tetraspanin 7; Transmembrane 4 superfamily, member 2</i>	Desconhecida; proteína transmembranal potencialmente envolvida na organização do citoesqueleto de actina e controle do crescimento de neuritos	<i>Truncating; Missense</i>	Zemni <i>et al.</i> , 2000; Maranduba <i>et al.</i> , 2004; Utine <i>et al.</i> , 2012
<i>UPF3B</i> ⁺	Xq24	300298	<i>UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B</i>	RNAm de sobrevivência e exportação nuclear	<i>Truncating</i>	Tarpey <i>et al.</i> , 2007
<i>USP9X</i> ⁺	Xp11.4	300072	<i>Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked</i>	Crescimento da migração neuronal; transdução do sinal ciliar	<i>Missense; Truncating; Deleção</i>	Homan <i>et al.</i> , 2014; Reijnders <i>et al.</i> , 2016
<i>ZDHHC15</i>	Xq13.3	300576	<i>Zinc finger DHHC-type containing 15</i>	Desconhecida	Deleção	Mansouri <i>et al.</i> , 2005
<i>ZNF41</i> ⁺	Xp11.3	314995	<i>Zinc finger protein 41</i>	Repressor putativo de transcrição	<i>Missense; Sítio de splicing</i>	Shoichet <i>et al.</i> , 2003
<i>ZNF674</i> ⁺	Xp11.3	300573	<i>Zinc finger protein 674</i>	Repressor putativo de transcrição	<i>Truncating</i>	Lugtenberg <i>et al.</i> , 2006
<i>ZNF711</i> ⁺	Xq21.1	314990	<i>Zinc finger protein 711</i>	Desconhecida; possivelmente repressor putativo de transcrição	<i>Truncating</i>	Tarpey <i>et al.</i> , 2009; Liang <i>et al.</i> , 2017; van der Werf <i>et al.</i> , 2017
<i>ZNF81</i> ⁺	Xp11.23	314998	<i>Zinc finger protein 81</i>	Repressor putativo de transcrição	<i>Missense</i>	Kleefstra <i>et al.</i> , 2004

⁺; genes também associados à *DILX* síndrome

Contudo, mesmo com o conhecimento do papel de vários desses genes, há aspectos a serem elucidados, como a contribuição de cada um deles na determinação da DI ou ainda as correlações genótipo-fenótipo, cuja análise depende da ampliação da investigação molecular em indivíduos afetados.

Nesse sentido, foi proposto o presente trabalho, considerando que estudos voltados à investigação etiológica da DI ampliam o conhecimento relativo aos fatores genéticos determinantes dessa condição, na medida em que podem levar à identificação de novas regiões cromossômicas e genes associados à mesma, bem como a caracterização de variantes raras e sua frequência em indivíduos com DI, além de contribuir para a diferenciação dos fenótipos clínicos. Além disso, também levados em conta os benefícios advindos da determinação do diagnóstico etiológico para o processo de aconselhamento genético e o atendimento global aos indivíduos com DI e suas famílias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar CNVs patogênicas em indivíduos do sexo masculino com hipótese diagnóstica de deficiência intelectual ligada ao X.

2.2. Objetivos específicos

- a) Identificar CNVs em genes do cromossomo X a partir da análise de *microarray* em uma amostra de indivíduos.
- b) Caracterizar as alterações, analisando relevância patogênica e envolvimento na determinação de DI.
- c) Realizar a correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos estudados.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP, sob o parecer N° 1.280.941, CAAE 45740415.8.0000.5404, conforme Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO 7.1).

3.1. Seleção da amostra

Participam deste estudo quatro indivíduos do sexo masculino com DILX, selecionados dentre 107 pacientes atendidos nos ambulatórios do Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da FCM/Hospital de Clínicas da UNICAMP (Figura 3). Todos foram previamente submetidos à avaliação clínica detalhada, além de exame de cariótipo convencional (bandamento GTG), investigação molecular para a SXF (*Southern Blot* ou MLPA ME029) e pesquisa de rearranjos subteloméricos (MLPA P036 e P070), com resultados dentro da normalidade. Inicialmente, os pacientes foram encaminhados para triagem de CNVs em genes do cromossomo X pelo *kit* SALSA MLPA P106 MRX probemix (*MRC-Holland*, Amsterdã, Holanda; Tabela II) (Henrique, 2015).

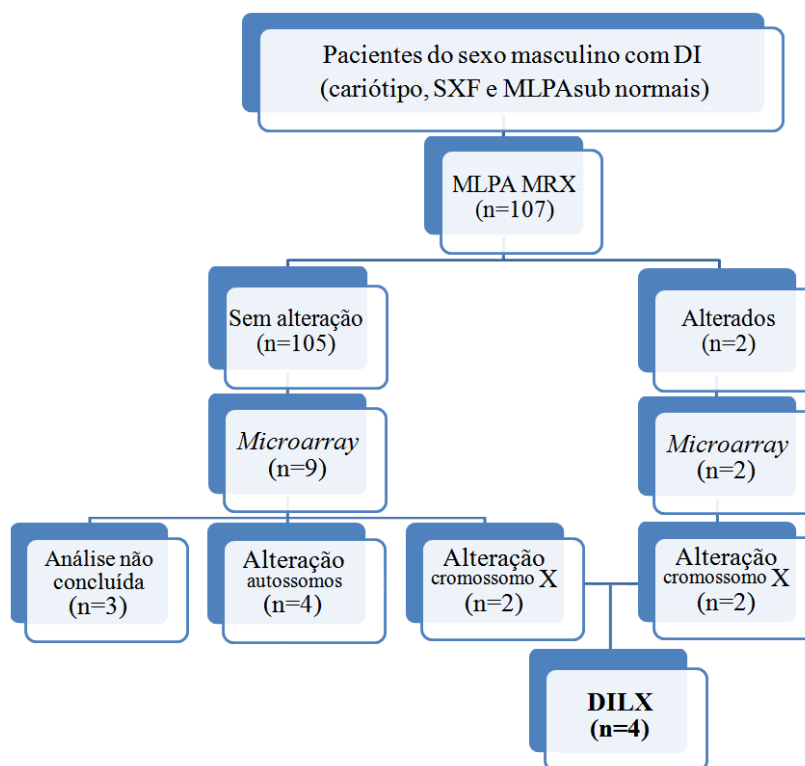


Figura 3. Seleção dos indivíduos incluídos no presente estudo.

Tabela II. Genes investigados pelo kit SALSA MLPA P106 MRX probemix.

Gene	Posição no cromossomo	Sondas no kit	Fenótipo associado
<i>RPS6KA3</i>	Xp22.12	Éxon 3/ Éxon 21	DI leve e síndrome de Coffin-Lowry
<i>ARX</i>	Xp21.3	Éxon 1/ Éxon 2/ Éxon 4	DI e espasmos infantis graves
<i>IL1RAPL1</i>	Xp21.3	Éxon 1/ Éxon 2/ Éxon 3/ Éxon 6	DI inespecífica
<i>TSPAN7</i>	Xp11.4	Éxon 1/ Éxon 5	DI
<i>PQBP1</i>	Xp11.23	Éxon 2b/ Éxon 5 ^a	DI com fenótipos variáveis
<i>HUWE1</i>	Xp11.22	Éxon 6/ Éxon 61	DI
<i>OPHN1</i>	Xq12	Éxon 1/ Éxon 3/ Éxon 12/ Éxon 21	DI sindrômica com epilepsia, alargamento ventricular rostral e hipoplasia cerebelar
<i>ACSL4</i> (<i>FACL4</i>)	Xq22.3	Éxon 1/ Éxon 12/ Éxon 17	Síndrome de Alport
<i>PAK3</i>	Xq22.3	Éxon 7/ Éxon 14/ Éxon 21/ Éxon 22	DI inespecífica
<i>DCX</i>	Xq23	Éxon 2/ Éxon 4/ Éxon 5	DI, lissencefalia e convulsões
<i>AGTR2</i>	Xq24	Éxon 1/ Éxon 3	DI inespecífica associada à convulsões
<i>ARHGEF6</i>	Xq26.3	Éxon 1/ Éxon 4/ Éxon 9/ Éxon 19	DI inespecífica
<i>FMR1</i>	Xq27.3	Éxon 9/ Éxon 16	SXF
<i>AFF2</i> (<i>FMR2</i>)	Xq28	Éxon 1/ Éxon 3/ Éxon 6/ Éxon 12/ Éxon 21	DI, Insuficiência ovariana prematura e Transtorno obsessivo-compulsivo
<i>SLC6A8</i>	Xq28	Éxon 4/ Éxon 9	DI
<i>GDI1</i>	Xq28	Éxon 1/ Éxon 7	DI inespecífica

Em prosseguimento da investigação, por meio de estudos colaboradores, houve a oportunidade de realizar o teste de *microarray* em nove pacientes sem alterações pela triagem por MLPA MRX, dos quais em três deles não foi possível concluir a análise; em quatro houve a detecção de alteração em cromossomos autossomos (Lincoln-de-Carvalho, 2017); e em dois foram identificadas alterações no cromossomo X. Além desses, visando o melhor detalhamento das CNVs, a análise por *microarray* também foi executada para os dois pacientes com resultado positivo na triagem por MLPA MRX. Em conjunto, os quatro pacientes com alterações identificadas no cromossomo X compõe a casuística deste estudo (Figura 3).

3.2. Rastreamento de CNVs

Descrita inicialmente ao final da década de 90 por Pinkel *et al.* (1998), a *array Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)* é uma variante da técnica de *CGH* convencional, que utiliza clones genômicos de interesse dispostos em lâminas, sendo a análise realizada comparativamente, com base nas intensidades da hibridização dos DNAs (referência e investigado) às sondas inseridas na lâmina.

A plataforma de *array-CGH* é constituída por um conjunto de oligonucleotídeos sintéticos fixados sobre uma placa, onde são hibridizados os DNAs previamente marcados com os corantes Cyanine 3-dCTP (Cy3) para amostra teste e Cyanine 5-dCTP (Cy5) para amostra controle (Chari, Lockwood & Lam, 2006) (Figura 4). Sua resolução é determinada pelo tamanho e espaçamento dos clones genômicos na matriz, permitindo analisar alterações consideradas submicroscópicas, perdas e ganhos de material genético, relacionadas a doenças genéticas com alto grau de sensibilidade.

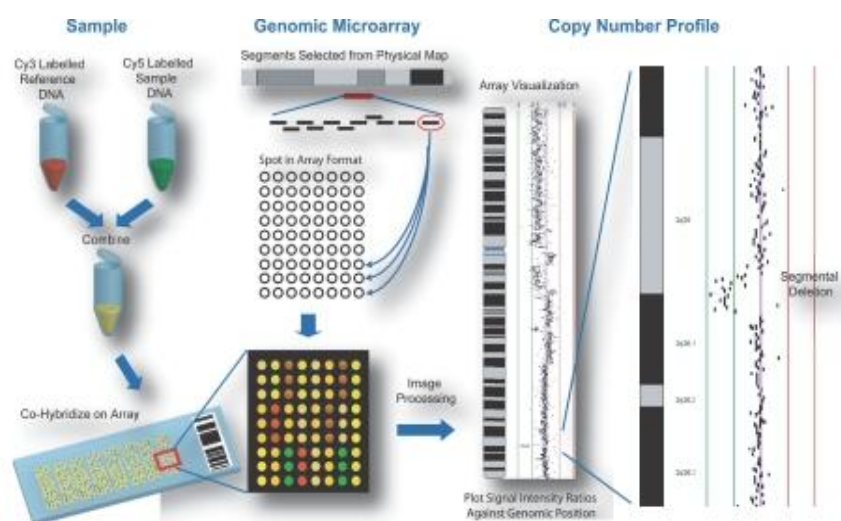


Figura 4. Hibridização Genômica Comparativa em arrays (*array-CGH*) (Chari, Lockwood & Lam, 2006).

Após a anuência do responsável mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 7.2), o teste de *microarray* foi realizado para dois pacientes via laboratório privado, solicitado para aqueles que dispunham de plano ou seguro de saúde e atendiam as Diretrizes de Utilização da ANS (Agência Nacional de Saúde Suplementar – Resolução Normativa RNº338, de 21/10/2013 e RNº387, de 28/10/2015, conforme o Rol de Procedimentos e Eventos em saúde) (pacientes P3 e P4), por meio da plataforma *CS3000* e *chip CytoScan 750k*

Cytogenetics Solution (Affymetrix, Santa Clara, Estados Unidos); e para outros dois (pacientes P1 e P2) o teste foi executado no Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP, em colaboração com projeto de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Íscia Lopes-Cendes, pesquisadora principal do Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão: Instituto Brasileiro de Neurociência e Neurotecnologia (*Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology, CEPID-BRAINN*).

No último, realizado com a colaboração do Prof. Dr. Fábio Rossi Torres, a técnica foi aplicada conforme padronização previamente estabelecida pelo laboratório, utilizando a plataforma *SurePrint G3 Human CGH Microarray 8x60K* (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), com 62.976 sondas distribuídas por todo o genoma, e ainda dos *kits* de reagentes compatíveis para a realização da técnica.

O protocolo foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante e seguiu as seguintes etapas:

1. Digestão das amostras (paciente e controle normal) com as enzimas *Alu I* e *Rsa I*.
2. Marcação das amostras de DNA por fluorescência (Cy3 e Cy5).
3. Purificação das amostras para retirada de nucleotídeos não incorporados.
4. Hibridização das amostras marcadas às lâminas e posterior lavagem.
5. Varredura das lâminas por meio do *SureScan Microarray Scanner* (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).
6. Escaneamento da lâmina e posterior análise das imagens e dados, por meio do programa *Agilent Cytogenomics Software* (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).

A análise dos dados foi descritiva, com auxílio de bancos públicos de variantes do genoma humano como *Ensembl Genome Browser*, *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), correlacionando a CNV identificada à sua contribuição no quadro clínico do paciente em questão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Paciente P1

Paciente nascido em 1993, primeiro filho de casal jovem, saudável e não consanguíneo; o único irmão é normal e, exceto por um primo em terceiro grau com síndrome de Down, sem antecedentes familiares relevantes. A gestação transcorreu bem; indicada cesárea, por sofrimento fetal agudo; peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento dentro dos padrões da normalidade, índice de Apgar de 8 e 9 (1º e 5º minuto). Apresentou convulsões neonatais, sendo realizados ultrassom transfontanela e tomografia computadorizada de crânio, que detectaram agenesia de corpo caloso e aumento discreto do sistema ventricular.

Evoluiu com atraso global do desenvolvimento/DI, epilepsia e baixa acuidade visual relacionada a atrofia do nervo óptico. Ao exame físico, observados dismorfismos craniofaciais como sobrancelhas espessas, pregas epicânticas internas, olhos de localização profunda, ponte nasal proeminente, palato alto e estreito, apinhamento dentário e sialorréia, além de prega palmar transversal única bilateral, cúbito valgo, pés planos, calcâneo proeminente, polegares e háluces alargados. Em avaliação recente, genitais externos masculinos com testículos tópicos, sendo o esquerdo ligeiramente maior que 25 cm³. Ultrassom abdominal e ecocardiograma normais.

A triagem de variantes no cromossomo X pelo método de *MLPA* indicou uma duplicação no gene *HUWE1* (Henrique, 2015). O teste de *microarray* foi realizado para melhor caracterização da variante detectada. A análise identificou o aumento de 0,4 Mb na região Xp11.22, ChrX(hg19): 53253932_53670215, e revelou que a alteração envolve não apenas *HUWE1*, mas cinco genes referenciados: *KDM5C*, *IQSEC2*, *SMC1A*, *HSD17B10* e *HUWE1*, todos relacionados à morbidade (<https://decipher.sanger.ac.uk/> *DECIPHER*, 2019) (Figura 5). A mesma alteração estava presente em heterozigose na mãe assintomática.

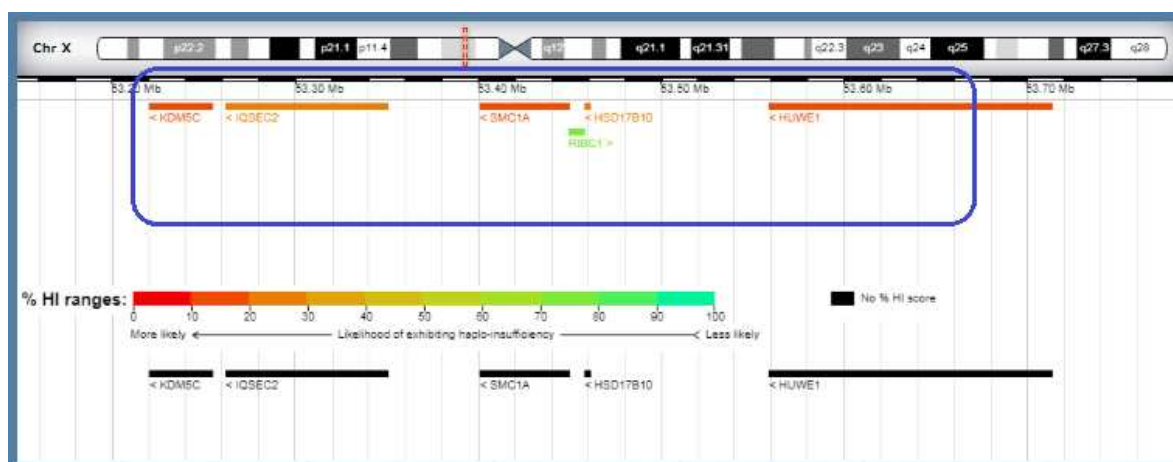


Figura 5. Mapeamento da região Xp11.22 com destaque para os genes duplicados no paciente P1 (<https://decipher.sanger.ac.uk/>).

A região Xp11.22 é rica em genes e compreende aproximadamente 5 Mb de DNA genômico, ChrX(hg19): 49800001_548000014 (Grau *et al.*, 2017), sendo considerada um intervalo crítico para diversos distúrbios neurogenéticos (Ropers & Hamel, 2005). Outros casos de duplicações sobrepostas em Xp11.22, incluindo a região duplicada no paciente P1 foram relatados anteriormente (Froyen *et al.*, 2008; Froyen *et al.*, 2012; Tran Mau-Them *et al.*, 2014; Santos-Rebouças *et al.*, 2015; Moey *et al.*, 2016) (Figura 6). No entanto, apesar do *cluster* de genes associados à DILX identificados nessa região, os pontos de quebra dos rearranjos são inconsistentes, dificultando associações genótipo-fenótipo precisas.

Entre os cinco genes duplicados no intervalo identificado, *KDM5C*, *SMC1A* e *HSD17B10* são frequentemente associados às formas sindrômicas de DI. Concisamente, variantes pontuais no gene *KDM5C* foram associadas à síndrome de Claes-Jensen (OMIM #300534), caracterizada por DI moderada a grave, anormalidades de fala e outros achados clínicos, como convulsões e comportamento agressivo (Jensen *et al.*, 2005; Tzschach *et al.*, 2006). No caso do *SMC1A*, deleções e variantes *missense* foram relacionadas com a síndrome de Cornelia de Lange do tipo 2 (OMIM #300590), condição clinicamente heterogênea caracterizada por atraso global do desenvolvimento e malformações que afetam múltiplos sistemas (Musio *et al.*, 2006; Hoppman-Chaney *et al.*, 2012). Variantes pontuais ou silenciosas levando a um defeito de *splicing* no gene *HSD17B10* podem resultar em neurodegeneração (OMIM #300438) (Ofman *et al.*, 2003; Lenski *et al.*, 2007). O espectro fenotípico associado à deficiência de *HSD10* inclui atraso global no desenvolvimento, hipotonia, convulsões (em geral descritas

como mioclônicas), perda progressiva da visão e (ou) audição, entre outras características (Seaver *et al.*, 2011).

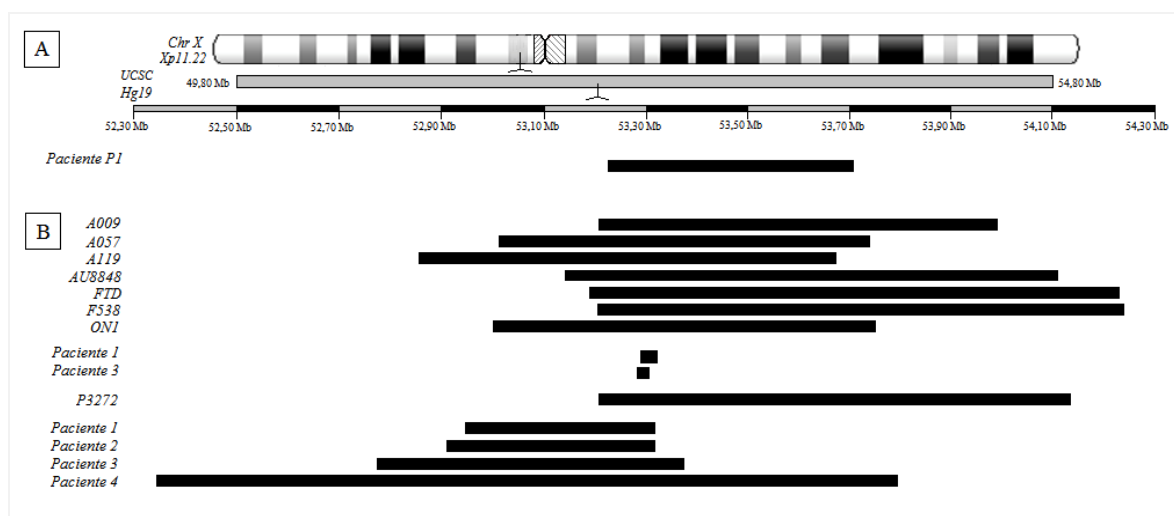


Figura 6. Representação esquemática de duplicações de Xp11.22 envolvendo o gene *IQSEC2* em pacientes com DI. (A) Duplicação de 0.4 Mb detectada no paciente P1. (B) Duplicações sobrepostas identificadas em pacientes reportados na literatura.

No entanto, até o momento, *HUWE1* e *IQSEC2* são os únicos genes na região duplicada considerados sensíveis à dosagem, e para os quais um aumento na expressão pode ser responsável pelo déficit cognitivo. O gene *HECT, UBA and WWE domain containing 1* (*HUWE1*, OMIM 300697) codifica uma E3 ubiquitina-ligase (marcadora de proteínas nocivas), necessária para marcação e subsequente degradação proteasomal via poli-ubiquitinação (Froyen *et al.*, 2008). A ubiquitina e a degradação proteica têm sido implicadas na função neuronal (Yi & Ehlers, 2007) e sua disfunção é um marco em várias doenças neurológicas (Ross & Pickart, 2004; Bennett *et al.*, 2007).

Variantes pontuais no *HUWE1* são associadas a uma forma sindrômica de DI do tipo Turner (OMIM, #300706) (Turner, Gedeon & Mulley, 1994; Froyen *et al.*, 2008), enquanto uma deleção de *HUWE1* nunca foi relatada na população humana (Vandewalle *et al.*, 2013). Esse fato pode ser explicado pela letalidade pré-natal no sexo masculino associada a essa variante, semelhante à explicação da ausência de mutações truncadas no *HUWE1* (Isrie *et al.*, 2013). Já o aumento da dosagem do gene *HUWE1* é considerado um evento não recorrente e pode ser responsável pelo comprometimento cognitivo, além de algumas anomalias *minor* (Froyen *et al.*, 2012). No entanto, um ganho parcial no número de cópias de *HUWE1* de aproximadamente 64 kb, como a

duplicação encontrada no paciente P1, parece não afetar a função da proteína *Huwei1*, provavelmente porque uma cópia do gene permanece intacta (Froyen *et al.*, 2012).

Embora um segmento considerável da região Xp esteja envolvido na maioria dos casos relatados, nem todas as duplicações Xp11.22 incluem o gene *HUWE1*, sugerindo o envolvimento de outros genes importantes para o fenótipo da DI na região (Giorda *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009; Holden *et al.*, 2010). Um exemplo é que variações do número de cópias em Xp11.22 incluindo o gene *IQSEC2* e que não se sobrepõem ao *HUWE1*, se associam a atraso global do desenvolvimento, DI, distúrbios comportamentais, incluindo ou não características autistas (Moey *et al.*, 2016). No entanto, é importante enfatizar que uma duplicação completa e isolada do gene *IQSEC2* não foi relatada até o momento.

O *IQ motif-and Sec7 domain-containing protein 2 (IQSEC2, OMIM 300522)* foi considerado gene candidato para distúrbios neurológicos ligados ao cromossomo X pela primeira vez em 2008, por Morleo e colaboradores. É altamente expresso no cérebro, e exerce um papel significativo na manutenção e homeostase cerebral, nos corpos celulares neuronais do hipocampo e no processo dendrítico (Gandomi *et al.*, 2014; Zerem *et al.*, 2016). O gene *IQSEC2* codifica um fator de troca de nucleotídeos guanina (GEF) que catalisa a troca de GDP em GTP em *Arf6*, um pequeno membro GTPase da família do fator de ribosilação de ADP (Moey *et al.*, 2016). Variantes patogênicas no *IQSEC2* podem levar à diminuição significativa da atividade do GEF, comprometendo a ativação do substrato *Arf6* e afetando, assim, a dinâmica da actina (Shoubridge *et al.*, 2010). Esta falha na homeostase do ambiente neural foi sugerida como provavelmente a via molecular subjacente ao comprometimento neurológico de pacientes com DI e alterações do *IQSEC2* (Shoubridge *et al.*, 2010).

Variantes não sinônimas no *IQSEC2* levando a pequenas perturbações funcionais são responsáveis por causar DILX inespecífica, enquanto variantes truncadas no mesmo gene podem gerar uma perda ainda mais grave de sua função (Tran Mau-Them *et al.*, 2014). Além disso, aumentos no número de cópias do *IQSEC2* são considerados patogênicos (Froyen *et al.*, 2012) e associados a um fenótipo comumente atribuído à dosagem excessiva de genes, devido à dissomia funcional da região duplicada (Bonnet *et al.*, 2006). Geralmente, esses rearranjos do cromossomo X são identificados em homens e herdados de mãe saudável (Nizon *et al.*, 2015). De fato, relatos de pacientes do sexo feminino com DI relacionada ao *IQSEC2* são relativamente infrequentes (Alexander-Bloch *et al.*, 2016). Sugeriu-se que as mulheres sejam capazes

de regular a expressão de *IQSEC2* mesmo com um aumento de sua dosagem gênica (Moey *et al.*, 2016), o que poderia explicar a ausência de DI na mãe do paciente P1. No entanto, como os homens normalmente têm uma única cópia do *IQSEC2*, variantes nesse gene podem ser patogênicas nesses pacientes, devido à falta de capacidade de regular o aumento da dosagem (Moey *et al.*, 2016).

Recentemente, Hinze *et al.* (2018) forneceram suporte adicional para a sensibilidade à dose do *IQSEC2*. Eles geraram o primeiro modelo de camundongos *knockout* para *IQSEC2*, a fim de investigar o impacto e a dosagem desse gene na morfologia neuronal, particularmente no desenvolvimento da coluna dendrítica. Em seu estudo, a superexpressão do *Iqsec2* do tipo selvagem revelou uma diminuição significativa no número de processos de neuritos nos estágios iniciais da cultura do neurônio, resultando em neurônios com axônios mais curtos e compactos, e exibindo ramificações dendríticas mais simples, fornecendo evidências das consequências dos desequilíbrios no gene *IQSEC2* (Hinze *et al.*, 2018).

Um fenótipo consistente de DILX inespecífica é observado em indivíduos com alterações no *IQSEC2* (Shoubridge *et al.*, 2010; Kalscheuer *et al.*, 2016). No entanto, alguns indivíduos afetados apresentaram características clínicas adicionais sugestivas de uma síndrome genética (Froyen *et al.*, 2008; Froyen *et al.*, 2012; Tran Mau-Them *et al.*, 2014; Santos-Rebouças *et al.*, 2015; Moey *et al.*, 2016) (Tabela III). O fenótipo pode incluir déficits significativos no desenvolvimento da fala, problemas comportamentais, hipotonia e microcefalia (Shoubridge *et al.*, 2010; Froyen *et al.*, 2012; Gandomi *et al.*, 2014; Tran Mau-Them *et al.*, 2014). Problemas visuais, como estrabismo e disfunção cortical, também são relatados (Tran Mau-Them *et al.*, 2014; Alexander-Bloch *et al.*, 2016), e ainda déficit de atenção e hiperatividade em alguns casos (Froyen *et al.*, 2008; Froyen *et al.*, 2012; Santos-Rebouças *et al.*, 2015). Convulsões graves são um achado comum, sendo frequentemente classificadas como encefalopatia epilética precoce (Zerem *et al.*, 2016).

Tabela III. Detalhes clínicos de indivíduos do sexo masculino com duplicações de Xp11.22 envolvendo o gene IQSEC2.

Indivíduo	Deficiência Intelectual	Epilepsia	Desenvolvimento de Linguagem	Alterações Oculares	Distúrbios Comportamentais	Outras Sinais/ Sintomas Clínicos	Coordenada ChrX(hg19) e Tamanho da Duplicação
Paciente P1	Moderada	Convulsões neonatais	Discurso gravemente comprometido	Atrofia do nervo óptico; Enofthalmia	Hiperatividade; Comportamento agressivo	Agenesia do corpo caloso e discreto aumento do sistema ventricular; Dismorfismos craniofaciais	53,253,932-53,670,215 416 kb
A009 Froyen <i>et al.</i> (2008)	Leve	–	Atraso de fala	–	Hiperatividade	Características faciais normais	53,220,275-53,981,275 761 kb
A057 Froyen <i>et al.</i> (2008)	Moderada	–	Discurso limitado	–	Hiperatividade	Ausentes	52,987,689-53,712,958 725 kb
A119 Froyen <i>et al.</i> (2008)	Leve-Moderada	Convulsões febris	Atraso de fala	–	Déficit de atenção; Hiperatividade	Sem dismorfismos significativos	52,825,617-53,662,768 837 kb
AU88848 Froyen <i>et al.</i> (2012)	Leve	–	–	–	–	–	53,169,907-54,101,252 931 kb
FTD Froyen <i>et al.</i> (2012)	Leve	Disfunção cortiço-subcortical	Atraso de fala	–	Déficit de atenção; Hiperatividade	Sopro cardíaco funcional; Vômito e diarreia crônicos, Urolitíase; Hérnia inguinal bilateral, Criptorquidia; Dismorfismos craniofaciais	53,198,95-54,237,527 1,038 kb
F538 Froyen <i>et al.</i> (2012)	Moderada	–	Discurso limitado; Gagueira	Pupilas desiguais	–	Perímetro cefálico aumentado	53,216,303-54,239,670 1,023 kb
ON1 Froyen <i>et al.</i> (2012)	Leve-Moderada	–	Discurso limitado	Microftalmia	Hiperatividade; Problemas de atenção; Comportamento de autodestrutivo	Dismorfismos craniofaciais	52,982,784-53,721,295 730 kb
Paciente 1 Tran Mau-Them <i>et al.</i> (2014)	Grave	Convulsões mioclônicas generalizadas	Ausente	Hipermetropia; Estrabismo	Movimentos estereotipados das mãos	Hipotonia neonatal, microcefalia pós-natal, hipercinesia, características faciais normais	53,283,513-53,325,284 42 kb
Paciente 3 Tran Mau-Them <i>et al.</i> (2014)	Grave	Epilepsia parcial	Regressão	Estrabismo	Movimentos estereotipados das mãos e de linha média	Hipotonia neonatal; Atrofia cerebral; Focos de hipersinal não específicos na substância branca periventricular; Dismorfismos <i>minor</i>	53,276,030-53,298,472 22 kb
P3272 Santos-Rebouças <i>et al.</i> (2015)	Moderada	Convulsões	Atraso de fala	–	Hiperatividade	Dismorfismos faciais	53,228,169-54,133,735 905 kb
Paciente 1 Moey <i>et al.</i> (2016)	Não determinada	–	Atraso de fala	–	Dificuldade de socialização; Problemas comportamentais	Comissuras bucais desviadas para baixo	52,954,520-53,315,542 361 kb
Paciente 2 Moey <i>et al.</i> (2016)	Leve-Moderada	–	–	–	Transtorno do espectro autista; Comportamento desafiador; Heteroagressividade; Aversão ao contato ocular	–	52,911,287-53,315,010 403 kb
Paciente 3 Moey <i>et al.</i> (2016)	Atraso global	–	Atraso de fala, Pronúncia mínima	–	Dificuldades comportamentais significativas	–	52,789,239-53,368,927 579 kb
Paciente 4 Moey <i>et al.</i> (2016)	Grave	Descargas lentas e agudas constantes	Ausente; Linguagem pouco receptiva	–	Sorridente e mãos agitadas	Hipotonia; Microcefalia; Hipogonadismo; Mioclonia; Ausência de marcha; Dismorfismos craniofaciais	52,341,517-53,782,896 1,441kb

Santos-Rebouças *et al.* (2015) descreveram pela primeira vez uma duplicação sobreposta da região Xp11.22 em dois indivíduos brasileiros não aparentados, com DI síndrômica. Ambos correspondiam a casos isolados na genealogia, nasceram por cesárea após gestação sem intercorrências e apresentavam dismorfismos faciais, como alterações nasais e palato alto, além de déficit cognitivo, características também observadas no paciente P1. Os dois apresentaram duplicação do gene *HUWE1*, enquanto o *IQSEC2* estava duplicado em apenas um deles. Curiosamente, esse último apresentou registros de eletroencefalograma compatíveis com convulsões, ao contrário do primeiro, cuja duplicação não incluiu *IQSEC2* (Santos-Rebouças *et al.*, 2015). Nesse cenário, essa diferença fenotípica favorece a hipótese do envolvimento da dosagem de *IQSEC2* em quadros epiléticos.

Os achados no paciente P1, em conjunto aos dados dos outros indivíduos afetados registrados na literatura, sugerem a região Xp11.22 como um *hotspot* para genes sensíveis à dosagem relacionados ao desenvolvimento das habilidades cognitivas. Além disso, reforçam a hipótese de que o gene *IQSEC2* está implicado na patogênese da DI síndrômica associada a convulsões, atraso de linguagem, alterações comportamentais, alterações visuais e dismorfismos faciais variáveis. Assim, a alteração do *IQSEC2* detectada no paciente P1 foi conclusiva para a elucidação diagnóstica, embora não seja possível excluir que a ocorrência de uma ruptura do(s) gene(s) no(s) ponto(s) de quebra da duplicação, além de efeitos posicionais dos genes no segmento alterado, também tenham contribuído para o fenótipo desse paciente.

4.2. Paciente P2

Paciente nascido em 1997, terceiro filho de casal não consanguíneo, sem antecedentes familiares relevantes. Durante a gravidez, houve risco de aborto a partir da 12ª semana e, várias internações após o sexto mês por trabalho de parto prematuro, com uso de terbutalina. Nasceu por cesárea, na 39ª semana, com peso 3340 g, comprimento 47 cm, perímetro cefálico 35 cm e Apgar 4/6. Encaminhado a UTI neonatal por taquipnéia transitória do recém-nascido; teve icterícia após 48 h sendo submetido a fototerapia e também a antibioticoteria por infecção neonatal, recebendo alta aos 10 dias de vida.

Evoluiu com infecções recorrentes de vias aéreas; submetido a herniorrafia inguinal e colocação de tubo de ventilação em ambos os ouvidos, além de funduplicatura de Nissen devido a refluxo gastroesofágico grave. Ao exame físico, com dois anos de idade, observados peso de 12 kg (3º-10º percentil), 90 cm de estatura (50º percentil) e perímetro cefálico de 51 cm (+1DP), dolicocefalia, espessamento da sutura metópica, implantação alta de cabelos na fronte, orelhas proeminentes, hipertelorismo, fendas palpebrais alongadas e com eversão do terço distal, cílios longos, ponte nasal alta com ponta voltada para baixo, columela curta, filtro curto e bem marcado, lábio superior em arco de cupido, palato alto, tórax escavado com aumento da distância intermamilar, mamilo esquerdo invertido, fôvea coccígea, *finger pads*, genitais externos masculinos normais. Na investigação complementar, submetido a tomografia computadorizada de crânio, radiografia de coluna total, eletrocardiograma, ecocardiograma, ultrassom abdominal, dosagem de imunoglobinas, audiometria e avaliação oftalmológica com fundoscopia, sem alterações; eletroencefalograma com atividade sugestiva de epileptogenicidade focal e generalizada.

Em reavaliação em 2015, aos 17 anos, apresentava DI grave, ausência de linguagem, agitação psicomotora; asma persistente com pneumonias recorrentes e disfagia. Houve suspeita inicial de hipogonadismo, não confirmado pelas dosagens de gonadotrofinas e testosterona. A ressonância magnética de crânio evidenciou anomalia de sinal parenquimatosa córtico-subcortical temporal anterior à direita, possivelmente relacionada a encefalomalácia/gliose pós-traumática; ventrículos laterais assimétricos e semi-verticalização dos sulcos colaterais, por provável má-rotação parcial hipocampal bilateral. Na ocasião, observado peso abaixo de 3%, estatura em 50%; perímetro

cefálico acima 98%; testículos tópicos com 12 cm³; face alongada, nariz e orelhas proeminentes, além dos dismorfismos descritos anteriormente.

O rastreamento inicial de variantes não identificou alterações nesse paciente. Em prosseguimento da investigação, foi realizada a análise por *microarray* cromossômico que identificou uma deleção intersticial de 16,4 Mb em Xq21.1q21.3, ChrX(hg19): 79658583_96048052, abrangendo 18 genes referenciados, seis deles relacionados a fenótipos patológicos: *BRWD3*, *POU3F4*, *ZNF711*, *POF1B*, *CHM* e *DIAPH2* (<https://decipher.sanger.ac.uk/> DECIPHER, 2019) (Figura 7). A mesma alteração estava presente em heterozigose na mãe assintomática.

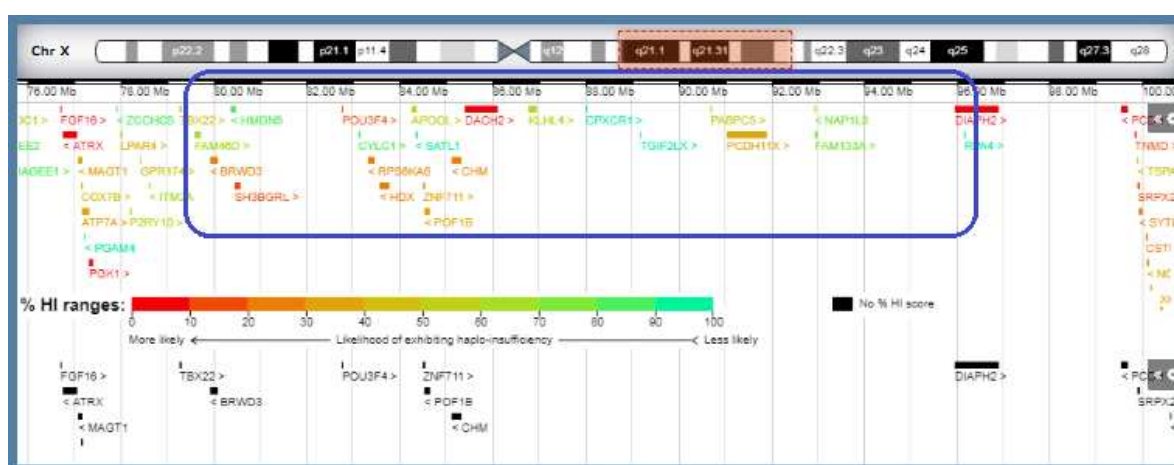


Figura 7. Mapeamento da região Xq21.1q21.3 com destaque para os genes deletados no paciente P2 (<https://decipher.sanger.ac.uk/>).

Deleções do braço longo do cromossomo X em homens são causa rara de DILX (Giordano *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2017). No entanto, alguns dos genes deletados no paciente P2 foram previamente descritos em distúrbios bem definidos como, por exemplo, na síndrome de deleção de genes contíguos envolvendo os genes *POU3F4* e *CHM* (OMIM #303110), caracterizada principalmente por atraso global no desenvolvimento e (ou) DI, perda auditiva e perda da visão.

O gene *pou domain, class 3, transcription factor 4* (*POU3F4*, OMIM 300039) codifica um fator de transcrição que medeia os sinais epigenéticos, induzindo a diferenciação do precursor do neurônio estriado (Shimazaki *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2017). É amplamente expresso durante o desenvolvimento do tubo neural e na maturação de neurônios recém-nascidos (Mathis *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 2010), desempenhando um papel crucial no desenvolvimento da orelha interna (Ryan,

Crenshaw & Simmons, 1991; Pollak *et al.*, 2016; Corvino *et al.*, 2018). Pela geração de produtos não-funcionais, disrupturas ou variantes no gene *POU3F4* foram implicadas em uma forma de surdez ligada ao X (DFNX2, OMIM #304400) (Choi *et al.*, 2012; Giordano *et al.*, 2015), também chamada de surdez condutiva com fixação do estribo (DFN3) (Whitehead & Vezina, 2014), caracterizada por perda condutiva e neurosensorial progressiva da audição e deformidade patognomônica do osso temporal (Phelps *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 2017).

O gene *CHM* (*CHM*, OMIM 300390) codifica a proteína 1 de escolta de Rab (REP-1), uma subunidade das GTPases envolvida na regulação do tráfego da membrana vesicular (Alexandrov *et al.*, 1994; Coussa & Traboulsi, 2012). Variantes que levam ao truncamento ou ausência completa da proteína *CHM* estão associadas à coroideremia (OMIM #303100), uma degeneração progressiva dos coriocalpares, do pigmento retiniano e da retina (McTaggart *et al.*, 2002; Coussa & Traboulsi, 2012). Os indivíduos afetados sofrem perda gradual da visão, inicialmente manifestada como cegueira noturna e redução dos campos periféricos, evoluindo até se tornarem legalmente cegos ao final da fase adulta (Battu *et al.*, 2016; Mitsios, Dubis & Moosajee, 2018).

Embora o atraso global no desenvolvimento e a DI estejam presentes em nosso paciente, os exames auditivos e oftalmológicos não demonstraram anormalidades relevantes, apesar da alteração envolver os genes *POU3F4* e *CHM*. No entanto, o paciente P2 necessitará de monitoramento audiológico, justificado neste caso, com base na forte predisposição à perda auditiva associada a defeitos no gene *POU3F4* (Choi *et al.*, 2012; Giordano *et al.*, 2015; Pollak *et al.*, 2016; Corvino *et al.*, 2018). Além disso, exames oftalmológicos periódicos também são indicados, considerando que os déficits visuais tendem a ser progressivos nos pacientes afetados (Cremers *et al.*, 1990; Song *et al.*, 2010; Battu *et al.*, 2016; Mitsios, Dubis & Moosajee, 2018).

Já os genes *POF1B* e *DIAPH2* foram associados a fenótipos de insuficiência ovariana prematura (IOP) (*POF2B*, OMIM #300604 e *POF2A*, OMIM #300511, respectivamente), distúrbio caracterizado por amenorreia e níveis elevados de gonadotrofinas em mulheres com menos de 40 anos de idade (Bione *et al.*, 2004; Lacombe *et al.*, 2006). O gene *POF1B* (*POF1B*, OMIM 300603) codifica uma proteína que desempenha um papel fundamental na organização de monocamadas epiteliais, regulando o citoesqueleto de actina (Padovano *et al.*, 2011). É expresso em níveis embrionário e pré-natais no ovário de camundongo, sugerindo que *POF1B* possa ser

crítico para o desenvolvimento precoce do ovário levando ao número final de células germinativas (Bione *et al.*, 2004). Já o gene ortólogo humano *diaphanous, drosophila, homolog of, 2* (*DIAPH2*, OMIM 300108) codifica uma proteína importante na divisão de células foliculares ovarianas (Castrillon & Wasserman, 1994). Alterações nesse gene afetaram a fertilidade em moscas, sugerindo o *DIAPH2* como um excelente candidato para a IOP (Rizzolio *et al.*, 2006; Genesio *et al.*, 2015).

O gene *zinc finger protein 711* (*ZNF711*, OMIM 314990) é um membro da família de proteínas *zinc-finger*, no qual a proteína codificada interage, como um cofator, com a desmetilase *PHF8* durante a ligação em genes alvo, sugerindo a participação do *ZNF711* na modulação transcricional (Tarpey *et al.*, 2009; Kleine-Kohlbrecher *et al.*, 2010). Apesar de poucos registros clínicos, acredita-se que uma perda no gene *ZNF711* possa estar implicada na patogênese da DILX inespecífica (MRX97, OMIM #300803).

Ao realizar o sequenciamento do exoma direcionado ao cromossomo X em 208 famílias com DILX, Tarpey *et al.* (2009) identificaram variantes truncadas no gene *ZNF711* em duas famílias com DI inespecífica (Tarpey *et al.*, 2009). Relatos clínicos de casos esporádicos também apóiam essa conexão patogênica (Jin *et al.*, 2015). Recentemente, em duas novas famílias com MRX97, foram identificadas uma deleção *frameshift* e uma variante *missense* em *ZNF711* (van der Werf *et al.*, 2017). Por meio de análise de expressão em cultura de células, van der Werf *et al.* (2017) mostraram que essas variantes induzem a expressão diferencial de genes conhecidos por serem expressos no cérebro, acrescentando evidências à função de *ZNF711* como um fator de transcrição.

No mesmo ano, Liang *et al.* (2017) descreveram um paciente com DI grave e dismorfismos faciais *minor*, associados majoritariamente à perda do *ZNF711*. Segundo esses autores, deleções Xq21 que não incluem o gene *ZNF711* não costumam se associar ao atraso do desenvolvimento (*Decipher* 289263 e 287836 / ISCA 582602, 3442681 e 578452), sugerindo que as alterações nesse gene possam ser uma causa independente de DI. No entanto, as variantes patogênicas no *ZNF711* representaram apenas 0,3% dos casos, mesmo em um conjunto altamente enriquecido pela seleção de famílias compatíveis com padrão de herança ligada ao X (Tarpey *et al.*, 2009). Além disso, apesar da DI moderada, as famílias com variantes truncadas no *ZNF711* não apresentaram características adicionais consistentes, dificultando o estabelecimento da

correlação genótipo-fenótipo. Assim, a real patogenicidade do gene *ZNF711* no fenótipo do paciente P2 permanece indeterminada.

Por outro lado, variantes envolvendo o gene *BRWD3* têm sido relacionadas a um distúrbio caracterizado por DILX e macrocefalia (OMIM #300659) (Grotto *et al.*, 2014), ambas presentes no paciente P2. O gene *bromodomain- and wd repeat-containing protein 3* (*BRWD3*, OMIM 300553) atua como um regulador positivo da via de sinalização Janus tirosina-quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT) (Müller *et al.*, 2005). Em *Drosophila melanogaster*, a JAK/STAT foi envolvida na sinalização intracelular, no crescimento e desenvolvimento embriológico (Hombría & Brown, 2002; Field *et al.*, 2007). Acredita-se que as variantes de perda de função de *BRWD3* levam a redução dessa atividade de sinalização, implicando a JAK/STAT como fator causal de DILX (Müller *et al.*, 2005; Field *et al.*, 2007).

Em 2007, duas variantes truncadas no gene *BRWD3* foram relatadas em quatro pacientes com DILX (Field *et al.*, 2007). Foi sugerido que, em isoformas proteicas mais longas, as variantes c.946-947insA e c.3325+1G>T podem causar o deslocamento do quadro de leitura, levando ao truncamento precoce da proteína dentro da região de repetição ou antes do primeiro bromodomínio, respectivamente, causando a perda de função do *BRWD3* (Field *et al.*, 2007). Posteriormente, Grotto *et al.* (2014) relataram um indivíduo com deleção parcial de 74 kb, incluindo os 30 últimos éxons do gene *BRWD3*, além de uma variante *nonsense* (c.3393C>G) segregando em quatro indivíduos do sexo masculino com DI síndrômica (Grotto *et al.*, 2014). O fenótipo dos nove pacientes relatados na literatura em conjunto com os dados do paciente P2 permitem delinear a possível apresentação clínica da DI relacionada a alterações no *BRWD3* (Tabela IV).

Tabela IV. Características fenotípicas frequentes em indivíduos do sexo masculino com variantes no gene *BRWD3*.

Indivíduo/Fenótipo	Deficiência Intelectual	Atraso de Fala	Macrocefalia	Hipotonia	Distúrbios Comportamentais	Características Faciais	Alterações Esqueléticas	Mãos e Pés Proeminentes	Malformações Congênicas	Variante em <i>BRWD3</i>
Paciente P2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Deleção Completa
Família 322 / Paciente III-6 Field <i>et al.</i> (2007)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	c.3325+1G> T
Família 322 / Paciente II-11 Field <i>et al.</i> (2007)	+	NE	+	NE	NE	+	+	-	-	c.3325+1G> T
Família 336 / Paciente II-1 Field <i>et al.</i> (2007)	+	+	+	NE	+	+	NE	-	+	c.946_947insA
Família 336 / Paciente II-2 Field <i>et al.</i> (2007)	+	+	+	+	+	+	NE	-	-	c.946_947insA
Família 15709 / Paciente 1 Grotto <i>et al.</i> (2014)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Deleção Parcial
Família W09-0806 / Paciente III-1 Grotto <i>et al.</i> (2014)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	c.3393C> G
Família W09-0806 / Paciente III-2 Grotto <i>et al.</i> (2014)	+	+	-	-	+	+	+	+	-	c.3393C> G
Família W09-0806 / Paciente III-3 Grotto <i>et al.</i> (2014)	+	+	+	-	-	+	+	+	-	c.3393C> G
Família W09-0806 / Paciente III-5 Grotto <i>et al.</i> (2014)	+	+	-	-	+	+	+	+	-	c.3393C> G
Score <i>n</i> =	(10/10)	(9/9)	(8/10)	(3/8)	(8/9)	(10/10)	(8/8)	(7/10)	(2/10)	

+; característica presente, -; normal, NE; não especificado

Todos os pacientes apresentaram atraso global do desenvolvimento e (ou) DI ($n = 10/10$), atraso de fala ($n = 9/9$) e dismorfismos faciais característicos ($n = 10/10$) incluindo face alongada, frontal alto, queixo pontudo e orelhas proeminentes. Além disso, macrocefalia ($n = 8/10$) e alterações esqueléticas ($n = 8/8$) principalmente peito escavado, também se destacam entre os pacientes afetados, assim como no paciente P2. Distúrbios comportamentais ($n = 8/9$) como comportamento introspectivo, mãos e pés proeminentes ($n = 7/10$) são igualmente relatados. Os sinais menos frequentes incluem hipotonia ($n = 3/8$) e anomalias congênitas ($n = 2/10$) como a criptorquidia, por exemplo. Características clínicas adicionais incluem hipogonadismo, transtorno alimentar e tendência à obesidade (Grotto *et al.*, 2014).

Desta forma, a comparação das funções dos genes incluídos na região Xq21 deletada e das características clínicas dos pacientes afetados, confirmam esse rearranjo como fator causal do quadro apresentado pelo paciente P2. Além disso, diferentemente dos demais indivíduos, o paciente P2 evoluiu com epilepsia e infecções recorrentes de vias aéreas, fenótipos que podem estar associados a variantes no gene *BRWD3*. No entanto, enquanto outros pacientes não forem descritos com os mesmos achados, não descartamos a possibilidade de que essas características tenham segregado independentemente neste paciente.

4.3. Paciente P3

Paciente nascido em 1999, segundo filho de casal jovem e consanguíneo (primos em 1º grau). Sua irmã apresenta baixa estatura e teve atraso para andar (21 meses); há recorrência familiar de blefaroptose (pai e tio paterno), orelha em abano (pai, tia e primos em 1º grau pelo lado paterno); além de primo em 1º grau (lado paterno) com hipospádia e um tio (lado materno) com dificuldade de aprendizado (chegou a frequentar instituição especializada). Durante a gestação, mãe informa movimentos fetais fracos e tardios, sem outras intercorrências relevantes; parto vaginal, a termo, peso 2.305 g e 45 cm (ambos ~5%); perímetro cefálico 33 cm e Apgar 8/9; referidos hipotonia, choro demorado e sucção débil.

Evoluiu com atraso leve do desenvolvimento psicomotor, teve dificuldade escolar, alteração de linguagem; atraso da dentição decídua (início aos 19 meses) com alterações ortodônticas; hipotireoidismo (faz reposição hormonal regularmente). Ao exame físico, com um ano e oito meses, observados baixa estatura, frontal alto, retração bitemporal, implantação alta dos cabelos na fronte e baixa na nuca; orelhas de implantação baixa, em concha e com relevo pobre; sobrancelhas esparsas, arqueadas e de orientação anômala; ptose palpebral bilateral (a do pai é unilateral); cílios longos; nariz de base alargada e ponta bulbosa; prognatismo leve; palato alto; língua plicada; respirador oral, voz anasalada, clinodactilia de 5º dedo (mãos), falanges distais alargadas; acavalgamento de artelhos (bilateral); pés valgos, inversão peno-escrotal parcial discreta, hipospádia balanoprepucial; algumas manchas hipercrômicas (região supra-púbica e pé esquerdo) e efélides (face e membros; semelhante à mãe); unhas quebradiças. Ecocardiograma sem anormalidade e atraso de idade óssea.

O rastreamento inicial de variantes não identificou alterações nesse paciente. Em prosseguimento da investigação, foi realizado o teste de *microarray* que identificou uma duplicação de 1,4 Mb em Xq26.2, ChrX(hg19): 132087424_133441978, incluindo cinco genes referenciados, dos quais apenas *GPC3* foi relacionado à morbidade (<https://decipher.sanger.ac.uk/> DECIPHER, 2019) (Figura 8). A mesma alteração estava presente em heterozigose na mãe assintomática.

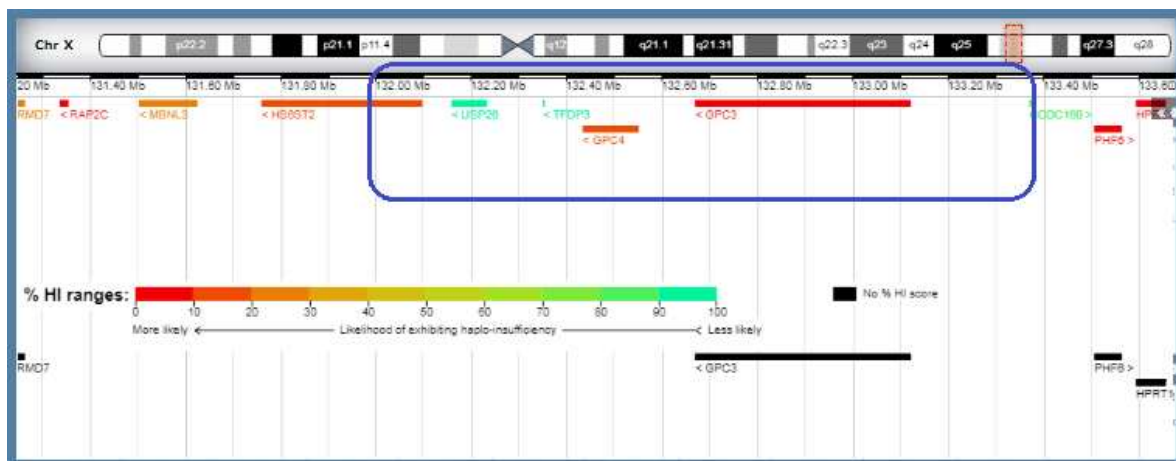


Figura 8. Mapeamento da região Xq26.2 com destaque para os genes duplicados no paciente P3 (<https://decipher.sanger.ac.uk/>).

O *glypican 3* (*GPC3*, OMIM 300037) codifica um membro da família glicicana que inclui seis proteoglicanos de heparan-sulfato de superfície de células de mamíferos (*GPC1* a *GPC6*), os quais estão ligados à superfície exocitoplasmática da membrana celular a através de uma ligação covalente de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Chiao *et al.*, 2002; Capurro *et al.*, 2008; Filmus, Capurro & Rast, 2008). *GPC3* é principalmente expresso em tecidos mesodérmicos embrionários, desempenhando papéis essenciais na regulação das vias de sinalização do crescimento celular (Capurro *et al.*, 2008; Filmus & Capurro, 2008).

A maioria das variantes de perda de função (deleções e diversas variantes pontuais) identificadas no gene *GPC3* é associada a uma síndrome de supercrescimento ligada ao X denominada Simpson-Golabi-Behmel (SSGB, OMIM #312870) (Chiao *et al.*, 2002; Schirwani *et al.*, 2019). A SSGB recebeu sua designação eponímica em 1988, após a observação de que Simpson *et al.* (1975), Golabi & Rosen (1984) e Behmel, Plöchl & Rosenkranz (1984) haviam descrito independentemente a mesma condição clínica (Neri *et al.*, 1988). Em 1996, três famílias carregando deleções no gene *GPC3* foram relatadas (Pilia *et al.*, 1996), demonstrando pela primeira vez uma relação entre *GPC3* e a SSGB. Além disso, camundongos portadores de um *knockout* do gene *GPC3* exibiram várias características fenotípicas que se assemelham a marcadores clínicos da SSGB, incluindo supercrescimento somático, displasia renal, baço acessório, polidactilia e placentomegalia (Chiao *et al.*, 2002).

O espectro de manifestações da SSGB é amplo, com fenótipos variando de formas leves em mulheres portadoras a uma forma infantil letal em homens (Neri *et al.*, 1998; Tenorio *et al.*, 2014). As características clínicas típicas incluem macrosomia pré e pós-

natal, atraso global no desenvolvimento e (ou) DI, facies peculiar e frequentemente relatada como “grosseira” (olhos proeminentes, hipertelorismo, macrostomia, macroglossia e má oclusão dentária), entre outras anomalias variáveis como defeitos cardíacos congênitos, hérnia diafragmática, mamilos supranumerários, anomalias gastrointestinais, renais e esqueléticas (Pilia *et al.*, 1996; Neri *et al.*, 1998; Cottureau *et al.*, 2013; Neri *et al.*, 2013). Além de supercrescimento e das malformações congênitas múltiplas, os indivíduos afetados possuem predisposição à progressão de tumores embrionários, incluindo tumor de Wilms, hepatoblastoma, rabdomiossarcoma, gonadoblastoma e neuroblastoma (Neri *et al.*, 1998; Lapunzina, 2005; Filmus & Capurro, 2008; Chan *et al.*, 2013; Cottureau *et al.*, 2013; Tenorio *et al.*, 2014).

Embora menos frequentes, as duplicações de *GPC3* também foram associadas à SSGB (Mateos *et al.*, 2013; Cottureau *et al.*, 2014; Kehrer *et al.*, 2016; Mujezinović *et al.*, 2016; Vuillaume *et al.*, 2018). Em 2010, uma duplicação do *glypican 4* (*GPC4*, OMIM 300168), um segundo gene que codifica outro membro da família glicicana, também foi associada ao fenótipo da SSGB (Waterson *et al.*, 2010). No entanto, esta duplicação patogênica e exclusiva de *GPC4* (Waterson *et al.*, 2010) é a única descrita até o momento, embora grandes duplicações abrangendo os genes *GPC3* e *GPC4* tenham sido relatadas (Mujezinović *et al.*, 2016; Vuillaume *et al.*, 2018). Além disso, nenhuma variante pontual foi detectada nesse gene (Cottureau *et al.*, 2013), sustentando *GPC3* como o principal contribuinte monogênico para a SSGB (Vuillaume *et al.*, 2018). Curiosamente, apesar de ambos estarem duplicados, a alteração dos genes *GPC3* e *GPC4* não resultou na SSGB no paciente P3.

Em revisão das duplicações Xq26 registradas em bancos de dados públicos, Vuillaume *et al.* (2018) observaram que, enquanto a maioria das duplicações intersticiais são rearranjos sequenciais (*in tandem*) (Newman *et al.*, 2015), quatro duplicações totalmente incluídas no *GPC3* (nssv584468, nssv13650346, *DECIPHER* 258050 e 326611) e duas duplicações com ponto de interrupção em 3'UTR do *GPC3* (nssv1415234, nssv13644225) podem levar a uma perda de função da *Gpc3*, interrompendo o quadro de leitura. Já ao considerar seis duplicações (nssv1610317, nssv3397178, nssvs579235 e *DECIPHER* 253888, 277238 e 278212) que incluíam o gene *GPC3* inteiro ou com apenas um ponto de interrupção em 5'UTR, postularam que provavelmente a proteína mantém a produção de um transcrito completo, ainda que não seja possível descartar a presença de um rearranjo intersticial do gene ou mesmo uma alteração de dosagem devido à um efeito posicional. Segundo os autores, esta

observação de mecanismo molecular foi identificada nos casos clínicos que não eram sugestivos de SSGB (Vuillaume *et al.*, 2018), o que possivelmente explicaria os achados no paciente P3.

Recentemente, um novo fenótipo foi associado à duplicação na região Xq26, incluindo o gene *GPC3*. Møller *et al.* (2014) identificaram duplicações intersticiais em Xq25q26 variando de 0,2 a 4,76 Mb em oito famílias não relacionadas, totalizando sete mulheres e cinco homens afetados. Os indivíduos descritos compartilharam um fenótipo comum, denominado pela primeira vez síndrome de Duplicação Xq25q26. Os homens afetados apresentaram atraso de crescimento intrauterino e pós-natal, além de dificuldades de alimentação na infância. Três deles apresentaram microcefalia e dois em cada cinco sofriam de epilepsia. Além disso, três homens possuíam uma aparência facial distinta com ptose bilateral congênita e orelhas proeminentes e dois deles apresentavam fenda palatina (Møller *et al.*, 2014).

Dentre as famílias com duplicações Xq25q26 relatadas por Møller *et al.* (2014), três indivíduos (probandos das famílias II, III e IV), além de outro paciente descrito posteriormente por Hirota *et al.* (2017), obtiveram regiões duplicadas sobrepostas à duplicação detectada em nosso paciente. A comparação do fenótipo do paciente P3 ao de outros indivíduos com síndrome de Duplicação Xq25q26 previamente relatados demonstrou semelhanças significativas entre os pacientes incluindo DI, atraso de fala, baixa estatura, ptose bilateral, ponte nasal larga, frontal alto, implantação alta de cabelos na fronte, orelhas de implantação baixa, clinodactilia, hipotonia e hipospadia, permitindo a conclusão diagnóstica desse paciente (Tabela V).

Tabela V. Detalhes clínicos de indivíduos do sexo masculino com síndrome de Duplicação Xq25q26.

Fenótipo	Paciente P3	Família II Møller <i>et al.</i> (2014)	Família III Møller <i>et al.</i> (2014)	Família IV Møller <i>et al.</i> (2014)	Paciente h Hirota <i>et al.</i> (2017)
Deficiência Intelectual	+	+	+	–	+
Epilepsia	–	Não especificado	+	Não especificado	Não especificado
Atraso de Fala	+	+	+	–	Não especificado
Atraso de Crescimento Intrauterino	+	+	+	+	+
Baixa Estatura	+	+	+	–	+
Alterações Cranianas	–	Microcefalia	Microcefalia	Microcefalia	Microcefalia
Dismorfismos Craniofaciais	Frontal alto; Implantação alta de cabelos na fronte; Retração bitemporal	–	Frontal alto; Face pequena	Frontal alto; Assimetria facial	Implantação baixa de cabelos na fronte
Região Ocular	Ptose bilateral; Sobrancelhas esparsas, arqueadas e anômalas; Cílios longos	Sinofre; Ptose bilateral; Blefarofimose; Telecanto	Ptose bilateral	Ptose bilateral; Fendas palpebrais oblíquas para baixo	Ptose; Blefarofimose
Região Nasal	Ponte nasal larga e ponta bulbosa	Ponta nasal larga; Narinas antevertidas; Filtro nasogeniano longo e plano	Ponta nasal larga; Filtro longo e plano	Ponte nasal larga; Narinas antevertidas	Ponte nasal larga
Região Oral e Mandíbula	Prognatismo leve; Palato alto	Pequena; Fenda palatina; Sinéquia oral; Dentes apinhados; Micrognatia	Lábio superior fino; Micrognatia	Lábio superior em tenda; Fenda palatina; Micrognatia; Sequência de Robin	Fenda palatina; Micrognatia
Orelhas	Implantação baixa, em concha e com relevo pobre	Grandes e displásicas	Grandes; Implantação baixa	Grandes; Displásicas; Baixa implantação	Implantação baixa
Cardiopatias Congênitas	–	–	–	–	++; Dupla via de saída ventricular; Atresia pulmonar
Defeitos Digitais	++; Clinodactilia nas mãos; Falanges distais alargadas	++; Clinodactilia e Camptodactilia nas mãos; Sindactilia nos pés;	++; Artrogripose em mãos	++; Clinodactilia bilateral; Sindactilia nos dedos do pé	++; Sindactilia
Anomalias Musculares	++; Hipotonia	++; Hipotonia	++; Redução de massa muscular	++; Hipotrofia	Não especificado
Anomalias Genitais	++; Inversão peno-escrotal parcial discreta; Hipospadia balanoprepucial	++; Hipospadia; Testículos pequenos; Criptorquidia	++; Hipospadia; Pênis pequeno, sem testículos palpáveis; Hipoplasia escrotal	++; Hipospadia glandular; Hipoplasia escrotal; Micropenis	++; Testículos e pênis pequenos; Fóvea sacrococcígea
Outros	Sucção débil; Atraso de dentição decídua e alterações ortodônticas; Hipotireoidismo	Cifo-escoliose torácica; Mãos e pés pequenos com dedos afilados	Válvula aórtica bicúspide; Escoliose toraco-lombar; Mãos e pés pequenos	Mãos e pés pequenos	Dedos afilados e sobrepostos

Além das manifestações fenotípicas da síndrome de Duplicação Xq25q26, o paciente descrito por Hirota *et al.* (2017) também apresentou doença cardíaca congênita, incluindo dupla via de saída do ventrículo direito e atresia pulmonar, sugerindo que estas manifestações podem fazer parte do fenótipo sindrômico. Contudo, apesar de outras características em comum, o paciente P3 não apresenta tais achados. De fato, diferentemente do nosso paciente, a região duplicada reportada no estudo de Hirota e colaboradores estendeu-se até a porção mais distal de Xq, incluindo o *locus MOSPD1*. Os autores sugeriram que, em combinação com *GPC3*, *MOSPD1* é um possível gene candidato para doença cardíaca congênita associada à síndrome de Duplicação Xq25q26 (Hirota *et al.*, 2017).

Em 2009, Sanlaville, Schluth-Bolard & Turleau compararam três grupos de indivíduos do sexo masculino com duplicações em Xq: distal (Xq26.3-qter), proximal (Xq21q24) e duplicações do *locus MECP2* (Xq28), concluindo que todas elas compartilham características semelhantes, apesar do conteúdo genômico diferente. Entretanto, embora os autores sugiram que possa haver um fenótipo comum e inespecífico associado às duplicações Xq em geral, no que tange as alterações Xq26 envolvendo o gene *GPC3*, as síndromes SSBG e de Duplicação Xq25q26 possuem características clinicamente distinguíveis.

Dessa forma, os achados detectados no paciente P3 em conjunto aos dados de estudos anteriores (Møller *et al.*, 2014; Hirota *et al.*, 2017) reforçam a caracterização de uma nova condição, denominada síndrome de Duplicação Xq25q26, identificada por atraso global no desenvolvimento e(ou) DI, atraso de fala, baixa estatura, *facies* característica (fronte alta, ptose bilateral, ponte nasal alargada e orelhas de implantação baixa), anomalias digitais e genitais, podendo incluir epilepsia e (ou) doença cardíaca congênita.

4.4. Paciente P4

Paciente nascido em 2002, quando sua mãe contava 37 anos, filho único de casal não consanguíneo; tem uma tia (lado materno) com síndrome de Down, um primo em 1º grau com síndrome de West e duas primas em 1º grau com dificuldade de aprendizado, todos pelo lado paterno, sem outros antecedentes familiares relevantes. Nasceu a termo, por cesárea, após gestação complicada por contrações uterinas a partir do 5º mês; encontrava-se em condições satisfatórias, com peso, comprimento e perímetro cefálico dentro da normalidade, Apgar 5 e 8, recebendo alta com dois dias de vida.

Evoluiu com atraso do desenvolvimento, em especial da fala, com déficit significativo de linguagem; teve comprometimento do crescimento pós-natal, com atraso de idade óssea e refluxo gastroesofágico até os 18 meses; na última avaliação, aos 16 anos, a estatura estava próxima ao 5º percentil e abaixo do limite inferior do canal familiar. Sem relato de convulsões até por volta dos 13 anos, quando apresentou de sete a oito episódios sugestivos de crises parciais, realizando diversos eletroencefalogramas e ressonância magnética de crânio sem alterações, com remissão após introdução de carbamazepina. Submetido a exame de cariótipo com técnica de alta resolução (800 bandas), triagem para erros inatos do metabolismo, avaliação oftalmológica, audiológica e endocrinológica, ecocardiograma, ultrassom de rins e vias urinárias, entre outros exames, todos sem alterações relevantes. Ao exame físico, observado microcefalia, implantação baixa de cabelos na fronte, sinofre, prega epicântica interna bilateral, estrabismo divergente, filtro nasolabial longo, lábio superior fino, microrretrognatia, palato alto, mamilos invertidos, clinodactilia de 5º dedo (mãos), pés planos, criptorquidia à direita (corrigida) e hipertricrose leve.

A triagem de variantes no cromossomo X pelo método de *MLPA* indicou uma duplicação englobando os genes *SLC6A8* e *GDII* (Henrique, 2015). Para melhor caracterização da alteração, o teste de *microarray* foi realizado e confirmou a duplicação, com extensão de aproximadamente 0,9 Mb em Xq28, ChrX(hg19): 152957300_153826362, incluindo 36 genes referenciados, entre eles *SLC6A8*, *BCAP31*, *ABCD1*, *SSR4*, *LICAM1*, *AVPR2*, *NAA10*, *HCFC1*, *MECP2*, *OPN1LW*, *OPN1MW*, *FLNA*, *EMD*, *RPL10*, *TAZ*, *ATP6AP1*, *GDII*, *LAG3*, *G6PD* e *IKBKKG*) relacionados a fenótipos patológicos (<https://decipher.sanger.ac.uk/> *DECIPHER*, 2019) (Figura 9). A mesma alteração estava presente em heterozigose na mãe assintomática.

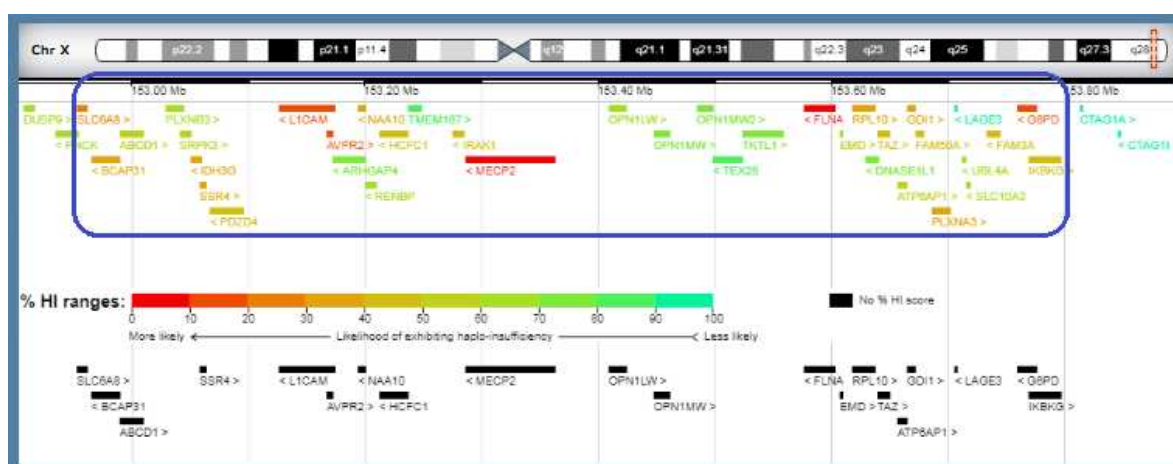


Figura 9. Mapeamento da região Xq28 com destaque para os genes duplicados no paciente P4 (<https://decipher.sanger.ac.uk/>).

Duplicações da região Xq28 são considerados os rearranjos cromossômicos mais frequentemente identificados em pacientes com DI, especialmente em homens (Shao *et al.*, 2008). Estima-se que tais rearranjos expliquem aproximadamente 1% dos casos de DI ligada ao X (Lugtenberg *et al.*, 2009; Ramocki, Tavyev & Peters, 2010), sendo a maioria observada no sexo masculino e herdada de uma mãe assintomática, com uma inativação preferencial do cromossomo X (El-Hattab *et al.*, 2011; El Chehadeh *et al.*, 2017), como no caso do paciente P4.

Embora as duplicações registradas na literatura tenham tamanhos altamente variáveis e incluam diversos genes adicionais (del Gaudio *et al.*, 2006; Ben-Shachar *et al.*, 2009), a maior parte dos estudos na região Xq28 tem sido direcionada para as variantes no gene *MECP2*. De fato, a região ao redor do *locus MECP2* é propensa à instabilidade genômica, contendo múltiplas repetições de baixa cópia (*Low Copy Repeats*, LCRs), predispondo a duplicações (del Gaudio *et al.*, 2006; Bauters *et al.*, 2008).

Três modelos foram propostos como possíveis mecanismos produtores desses rearranjos: o mecanismo replicativo de forquilha e troca de modelos (FoSTeS) (Carvalho *et al.*, 2009); a replicação induzida por interrupção mediada por Microhomologia (MMBIR) (Bauters *et al.*, 2008) e a junção final não-homóloga seguida por um mecanismo de reparo induzido por quebra (NHEJ) (Bauters *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). A presença de LCRs nas regiões vizinhas ao *MECP2* pode induzir uma estrutura de DNA instável e, consequentemente, levar a lesões de fita de

DNA e forquilhas colapsadas que facilitam o uso de FoSTeS/MMBIR durante o processo de replicação (Carvalho *et al.*, 2009).

Os homens afetados podem manifestar uma combinação de fenótipos variáveis que foram inicialmente reconhecidos como síndrome de Lubs (OMIM #300260) (Lubs *et al.*, 1999), incluindo hipotonia, infecções respiratórias recorrentes, DI grave, ausência do desenvolvimento da fala, convulsões e espasticidade (Meloni *et al.*, 2000; Meins *et al.*, 2005; van Esch *et al.*, 2005). O efeito prejudicial das duplicações de *MECP2* foi demonstrado em um modelo de camundongo no qual a superexpressão de *Mecp2* resultou em um distúrbio neurológico progressivo semelhante à doença humana (Collins *et al.*, 2004). Posteriormente, o *MECP2* foi considerado o principal gene sensível à dosagem responsável pelos fenótipos neurológicos envolvendo a região Xq28, fazendo com que a condição descrita anteriormente como Lubs fosse renomeada como síndrome de Duplicação *MECP2* (Ramocki, Tavyev & Peters, 2010; van Esch, 2012).

O gene *methyl-CpG-binding protein-2* (*MECP2*, OMIM 300005) codifica uma proteína associada à cromatina que atua como regulador da expressão gênica dependente de atividade, integrando sinais de ativação neuronal e marcas epigenéticas para controlar centenas de genes expressos no cérebro (Chahrour *et al.*, 2008; Ben-Shachar *et al.*, 2009; Adkins & Gorgel, 2011; Neira *et al.*, 2013). Níveis anormais de *Mecp2* podem resultar na desregulação de seus genes-alvo, levando à modulação inadequada das vias reguladas por *Mecp2*, causando uma maturação neuronal deficiente (Gonzales & LaSalle, 2010). Em camundongos, a superexpressão de *Mecp2* causou um distúrbio neurológico progressivo semelhante à síndrome de Duplicação *MECP2* humana, incluindo movimentos estereotipados e repetitivos, epilepsia, espasticidade, hipoatividade, tremor, ataxia e morte prematura (Collins *et al.*, 2004).

Com exceção da DI e do comprometimento significativo da linguagem, as características do paciente P4 não são consistentes com a síndrome de Duplicação *MECP2* típica, pois não há história de hipotonia infantil, espasticidade progressiva e, apesar do relato de crises parciais, não foi caracterizada epilepsia. De fato, atualmente, o *MECP2* já foi implicado em diversos fenótipos que se estendem além da síndrome clinicamente definida que leva seu nome. Diversas análises de pontos de quebra em homens afetados (Clayton-Smith *et al.*, 2009; Vandewalle *et al.*, 2009; Fusco *et al.*, 2010; Ramocki, Tavyev & Peters, 2010; El-Hattab *et al.*, 2011; Honda *et al.*, 2012) sugeriram que genes adjacentes podem ser responsáveis por variações no fenótipo. Além disso, embora o gene tenha sido inicialmente relacionado às principais

características da síndrome de Duplicação *MECP2*, a região duplicada considerada crítica na determinação dessa condição não envolve exclusivamente o *MECP2*, mas também o gene *IRAK1* (del Gaudio *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2009; Ramocki, Tavyev & Peters, 2010; Sanmann *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2013; Yon *et al.*, 2017), ambos duplicados no paciente P4.

O gene *interleukin 1 receptor-associated kinase 1* (*IRAK1*, OMIM 300283) pertence a uma família única de proteínas quinases que desempenham um papel fundamental nas cascatas de sinalização de duas famílias de receptores, Toll-like (TLRs) e interleucina 1 (IL-1Rs) (Gottipati, Rao & Fung-Leung, 2008). Como esses receptores estão envolvidos na modulação de respostas inflamatórias e imunes (Gottipati, Rao & Fung-Leung, 2008), foi considerado que pudessem se relacionar a maior suscetibilidade a infecções observada na maioria dos indivíduos com duplicações Xq28 (Kirk *et al.*, 2010). Entretanto, o paciente P4 não apresentou episódios de infecções recorrentes.

Dentre os genes duplicados no intervalo crítico do paciente P4, além do *MECP2* e do *IRAK1*, os genes *SLC6A8*, *LICAM*, *FNLA*, *GDII* e *IKBKG* também possuem uma alta expressão no tecido cerebral, sendo previamente associados a doenças neurológicas (Vandewalle *et al.*, 2009; Fusco *et al.*, 2010; Ramocki, Tavyev & Peters, 2010; Honda *et al.*, 2012; Neira *et al.*, 2013). O gene *solute carrier family member 8* (*SLC6A8*, OMIM 300036) desempenha papel importante na fisiologia muscular e no transporte da creatina (Salomons *et al.*, 2001), uma amina considerada essencial para a função cerebral adequada (Salomons *et al.*, 2003). Pacientes com variantes pontuais em *SLC6A8* apresentam síndrome de Deficiência de Creatina ligada ao X (OMIM, #300352), caracterizada por atraso global do desenvolvimento / DI, além de atraso significativo de fala e linguagem, epilepsia e comportamento autista (Salomons *et al.*, 2003; van de Kamp *et al.*, 2013). Considerando a DI e o comprometimento de fala e linguagem, é plausível supor que o *SLC6A8* tenha contribuído para o fenótipo do paciente P4, no entanto, vale ressaltar que essa característica é frequentemente descrita em associação a variações no *MECP2*. Além disso, apesar de mais de 140 variantes já terem sido identificadas no *SLC6A8* (Wang *et al.*, 2018), não há registro de uma duplicação isolada até o momento, dificultando o estabelecimento da correlação genótipo-fenótipo adequada associada a esse gene.

O gene *L1 cell adhesion molecule* (*LICAM*, OMIM 308840) codifica uma glicoproteína axonal encontrada principalmente no sistema nervoso, envolvida nos

processos de migração e diferenciação neuronal, como adesão, migração, crescimento de neuritos e mielinização (Okamoto *et al.*, 2004). Variantes no gene *LICAM* foram relacionadas à patogênese de diversas condições ligadas ao X clinicamente sobrepostas, como hidrocefalia isolada ou associada à doença de Hirschsprung (OMIM #307000), síndromes MASA (DI, afasia, marcha arrastada e polegares aduzidos) e CRASH (hipoplasia do corpo caloso, DI, polegares aduzidos, paraplegia espástica e hidrocefalia (OMIM #303350), além de agenesia parcial do corpo caloso (OMIM #304100) (Du, Srivastava & Schwartz, 1998; Fernández *et al.*, 2010; Vos *et al.*, 2010; Otter *et al.*, 2017). Especificamente quanto à duplicações, Van Camp *et al.* (1993) e Fernández *et al.* (2010) detectaram duplicações do gene *LICAM*. Os primeiros relatam que essa alteração resultou em um *splicing* anormal do RNAm, alterando a sequência de aminoácidos, em uma família com recorrência de hidrocefalia e DI, enquanto o segundo grupo de autores descreveu uma duplicação do *LICAM* em um paciente com encefalopatia neonatal e doença de Hirschsprung. No entanto, a participação desse gene no quadro clínico do paciente P4 permanece incerta, uma vez que o atraso do desenvolvimento também pode se relacionar aos demais genes envolvidos na duplicação. De fato, com exceção da DI, as características dos pacientes com variantes de perda de função em *LICAM* podem não ser esperadas em pacientes com duplicações deste gene (Lugtenberg *et al.*, 2009).

A proteína de ligação à actina codificada pelo gene *filamin A* (*FLNA*, OMIM 300017) reticula a F-actina e liga as proteínas de forma consistente com suas funções, relacionadas à sinalização celular e formação do citoesqueleto (Clark *et al.*, 2009). Variantes no gene *FLNA* causam um amplo espectro de malformações congênitas, afetando estruturas craniofaciais, esqueleto, cérebro, vísceras e trato urogenital (Robertson *et al.*, 2003). O *FLNA* é um gene sujeito à inativação do X (Clark *et al.*, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2009), sendo descrito como causa relevante dos distúrbios gastrintestinais observados em alguns homens com duplicações Xq28, que incluem risco de aspiração e dificuldade com alimentação por via oral devido à disfunção da deglutição (Ramocki, Tavyev & Peters, 2010), o que poderia explicar os episódios de refluxo gastroesofágico do paciente P4, além de alterações do trânsito intestinal que podem variar de uma constipação leve a moderada (como no presente caso) até uma pseudo-obstrução intestinal crônica (OMIM #300048) (Clayton-Smith *et al.*, 2009; Ramocki, Tavyev & Peters, 2010; Lim *et al.*, 2016; Yi *et al.*, 2016). Ademais, nos casos em que a duplicação de Xq28 não abrange o gene *FLNA*, é cogitado que o *MECP2* pode

alterar as regiões reguladoras de *FLNA* levando a problemas gastrointestinais (Ramocki, Tavyev & Peters, 2010), demonstrando a importância do *MECP2* no controle de vias genéticas relacionadas.

Codificando uma proteína que regula a reação de troca GDP-GTP dos membros da família Rab (Bianchi *et al.*, 2009), o gene *GDP dissociation inhibitor 1* (*GDII*, OMIM 300104) é altamente expresso no cérebro de camundongos, especialmente no córtex e hipocampo (Vandewalle *et al.*, 2009). As variantes de *GDII* podem diminuir a afinidade entre o gene e suas proteínas de ligação, causando perda de função (Rejeb, Jemaa & Chaabouni, 2009), ou até mesmo gerando uma ruptura do processo de exocitose da vesícula sináptica (Kaufman, Ayub & Vicent, 2010). Além da DI, duplicações do gene *GDII* são frequentemente associadas à microcefalia (Madrighal *et al.*, 2007b; Lugtenberg *et al.*, 2009; Vandewalle *et al.*, 2009), e a hipoplasia do corpo caloso (Honda *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2014). Considerando que a microcefalia não é uma característica consistente de pacientes com síndrome de Duplicação *MECP2* (Lugtenberg *et al.*, 2009), a superexpressão de *GDII* seria uma provável causa dessa característica no paciente P4.

O gene *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in b cells, kinase of gamma* (*IKBKG*, OMIM 300248) é o membro fundador de uma família evolutivamente conservada de quinases tipo NEMO que funcionam em numerosas vias de sinalização celular (Chiu, Ko & Edery, 2011). Está principalmente relacionado à incontinência pigmentar ligada ao X (OMIM #308300) (Fusco *et al.*, 2012; Honda *et al.*, 2012), um distúrbio de pigmentação da pele, bem como anormalidades em outros tecidos ectodérmicos como dentes, cabelos, unhas, olhos (Conte *et al.*, 2014), e no sistema nervoso central, tais como convulsões, distúrbios motores e DI (Minić, Trpinac & Obradović, 2013). Como o *IKBKG* está localizado na região propensa ao rearranjo, foi considerado que tenha participação no fenótipo de DI, induzindo a hipoplasia do corpo caloso em pacientes com duplicações Xq28 (Fusco *et al.*, 2010; Honda *et al.*, 2012). No entanto, embora sua alteração possa ter resultado em algum efeito no fenótipo, a real patogenicidade do *IKBKG* no paciente P4 permanece indefinida. Sendo assim, estudos com a identificação de duplicações isoladas dos genes adjacentes do cluster Xq28 acima citados podem ser especialmente úteis para delinear as reais implicações clínicas desses genes.

Grande parte dessa variabilidade em torno dos distúrbios de Xq28 tem sido considerada hipoteticamente como causada por modificadores genéticos, variantes de

genes envolvidos nas vias reguladas pelo *MECP2* (Lugtenberg *et al.*, 2009; Gonzales & LaSalle, 2010; Ramocki, Tavyev & Peters, 2010; Breman *et al.*, 2011; Honda *et al.*, 2012; Sanmann *et al.*, 2012). De fato, as duplicações que resultam no rompimento de regiões regulatórias de genes próximos em Xq28 podem não levar ao fenótipo clássico, mas podem contribuir ou até mesmo modificar a gravidade das características clínicas resultantes da síndrome de Duplicação *MECP2* (Gonzales & LaSalle, 2010; Sanmann *et al.*, 2012). Além disso, fatores de suscetibilidade genética, tanto prejudicial quanto protetora, assim como níveis variáveis de expressão de RNAm dos genes duplicados oferecem possíveis bases genéticas para o espectro fenotípico dessa condição (Sanmann *et al.*, 2012).

Nesse sentido, foi recentemente proposto que as regiões duplicadas de Xq28 responsáveis pela DI sejam separadas em três regiões distintas: *MECP2* (síndrome de Duplicação *MECP2*, OMIM #300260) (Meins *et al.*, 2005; van Esch *et al.*, 2005); *GDII* (síndrome de Duplicação Xq28 mediada por LCRs designadas como “K” e “L”, OMIM #300815) (Vandewalle *et al.*, 2009); e *RAB39B* (síndrome de Duplicação Xq28 mediada pelo íntron 22 região homóloga 1 (int22h-1) e 2 (int22h-2), OMIM #300815) (El-Hattab *et al.*, 2011), dependendo de qual parte da banda estiver duplicada (Yamamoto *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2018). A predisposição a infecção, epilepsia, e espasticidade parecem ser a principal distinção fenotípica entre a duplicação mediada por K/L e a mediada por int22h-1/int22h-2, como detalhado no estudo de Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 2018).

Apesar das três condições mencionadas acima, eventos de duplicação combinada de genes Xq28, como o apresentado pelo paciente P4, também são relatados com frequência. A variabilidade fenotípica observada nessas duplicações particulares de Xq28 dificulta a determinação de qual parte do fenótipo pode ser atribuída a cada gene duplicado especificamente. No entanto, em casos combinados, a duplicação do *MECP2* poderia ser considerada um fenótipo dominante em relação às síndromes de Duplicação Xq28 distais (Ward *et al.*, 2018). Ward *et al.* (2018) observaram por meio da análise de estudos anteriores (Lugtenberg *et al.*, 2009; Bartsch *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2014) que cenários de duplicações abrangendo *MECP2* e *GDII* ou *MECP2*, *GDII* e *RAB39B* possuem um fenótipo indistinguível da síndrome de Duplicação *MECP2*. Contudo, embora as características altamente similares dos pacientes relatados sejam principalmente atribuídas à superexpressão do *MECP2*, efeitos de dosagem de qualquer

um dos outros genes dentro da duplicação não podem ser excluídos (Bauters *et al.*, 2008).

Em resumo, o paciente P4 apresenta uma duplicação intersticial além da região mais curta sobreposta à síndrome de duplicação *MECP2*, incluindo os genes *FLNA* e *GDII*, mas não distal o suficiente para incluir o *RAB39B*. Além da DI e do atraso de fala, próprios da síndrome de Duplicação *MECP2*, o paciente apresentou sinais adicionais como refluxo gastroesofágico e microcefalia que foram associadas a genes adjacentes também duplicados no segmento. Com base na menor região de sobreposição em indivíduos relatados com duplicações Xq28, destacamos que a dosagem aumentada do *MECP2* pode, em si, ser responsabilizada pelo fenótipo da DI, embora nossos resultados também apóiem a hipótese de que outros genes Xq28 sensíveis à dosagem, como *FLNA* e *GDII*, quando duplicados, modulem o fenótipo dos indivíduos afetados.

5. CONCLUSÕES

A análise molecular por *microarray* permitiu a caracterização de quatro CNVs patogênicas no cromossomo X, sendo três duplicações e uma deleção, em regiões sabidamente associadas à DI. Dentre as alterações, os genes *IQSEC2*, *BRWD3*, *GPC3*, *MECP2*, *FLNA* e *GDII* foram determinantes na contribuição do fenótipo dos indivíduos da casuística.

Os resultados deste estudo corroboram a relevância das variantes patogênicas do cromossomo X entre os fatores genéticos da DI e permitiram a elucidação diagnóstica e o aconselhamento genético adequado para as famílias envolvidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins NL, Georgel PT. MeCP2: structure and function. *Biochem Cell Biol* 2011; 89(1): 1-11.

Alexander-Bloch AF, McDougleb CJ, Ullmann Z, Sweetser DA. *IQSEC2* and X-linked syndromal intellectual disability. *Psychiatr Genet* 2016; 101-108.

Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC, Zerial M. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *Eur Mol Biol Organ (EMBO) J* 1994; 5262-5273.

Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA *et al.* *PAK3* mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* 1998; 25-30.

American Psychiatric Association, APA. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. APA 2013; Washington DC, 5^o ed.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington, DC; 2013.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 185-188.

Anazi S, Maddirevula S, Fageih E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE *et al.* Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry* 2017; 615-624.

Antonarakis SE, Beckmann JS. Mendelian disorders deserve more attention. *Nat Rev Genet* 2006; 277-282.

Bartnik M, Derwinska K., Gos M, Obersztyn E, Kolodziejska KE, Erez A *et al.* Early-onset seizures due to mosaic exonic deletions of *CDKL5* in a male and two females. *Genet Med* 2011; 447-452.

Bartsch O, Gebauer K, Lechno S, van Esch H, Froyen G, Bonin M *et al.* Four unrelated patients with Lubs X-linked mental retardation syndrome and different Xq28 duplications. *Am J of Med Genet A* 2010; 305-312.

Basehore MJ, Michaelson-Cohen R, Levy-Lahad E, Sismani C, Bird LM, Friez MJ *et al.* Alpha-thalassemia intellectual disability: variable phenotypic expression among males with a recurrent nonsense mutation - 109C>T (p.R37X). *Clin Genet* 2015; 461-466.

Basit S, Malibari OI, Al-Balawi AM, Afzal S, Eldardear AE, Ramzan K. Xq21.31-q21.32 duplication underlies intellectual disability in a large family with five affected males. *Am J Med Genet A* 2016; 87-93.

- Bassani S, Zapata J, Gerosa L, Moretto E, Murru L, Passafaro M. The neurobiology of X-linked intellectual disability. *Neuroscientist* 2013; 541-552.
- Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: an overview. *Am J Med Genet Part C (Semin Med Genet)* 2003; 3-14.
- Battu R, Jeyabalan N, Murthy P, Reddy KS, schouten JS, Webers CA. Genetic analysis and clinical phenotype of two Indian families with X-linked choroideremia. *Indian J Ophthalmol* 2016; 924-929.
- Bauters M, van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM *et al.* Nonrecurrent *MECP2* duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* 2008; 847-858.
- Behmel A, Plöchl E, Rosenkranz W. A new X-linked dysplasia gigantism syndrome: identical with the Simpson dysplasia syndrome? *Hum Genet* 1984; 409-413.
- Bennett EJ, Shaler TA, Woodman B, Ryu KY, Zaitseva TS, Becker CH *et al.* Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 2007; 704-708.
- 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; 1269-1279.
- Ben-Shachar S, Chahrour M, Thaller C, Shaw CA, Zoghbi HY. Mouse models of MeCP2 disorders share gene expression changes in the cerebellum and hypothalamus. *Hum Mol Genet* 2009; 2431-2442.
- Bianchi V, Farisello P, Baldelli P, Meskenaite V, Milanese M, Vecellio M *et al.* Cognitive impairment in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training. *Hum Mol Genet* 2009; 105-117.
- 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 Molec Genet* 2002; 981-991.
- Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* 2014;2418-2425.
- 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; 923-926.
- Bione S, Rizzolio F, Sala C, Ricotti R, Goegan M, Manzini MC *et al.* Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, *DACH2* and *POF1B*. *Hum Reprod* 2004; 2759-2766.

- Bissar-Tadmouri N, Donahue WL, Al-Gazali L, Nelson SF, Bayrak-Toydemir P, Kantarci S. X chromosome exome sequencing reveals a novel *ALG13* mutation in a nonsyndromic intellectual disability family with multiple affected male siblings. *Am J Med Genet* 2014; 164-169.
- 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; 815-821.
- Borelina D, Engel N, Esperante S, Ferreira V, Ferrer M, Torrado M *et al.* Combined Cytogenetic and molecular analyses for the diagnosis of Prader-Willi/Angelman syndromes. *J B and Mol Bio* 2004; 522-526.
- Bouazzi H, Lesca G, Trujillo C, Alwasiyah MK, Munnich A. Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel *MED12* missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]. *Clin Case Rep* 2015; 604-609.
- Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 1276-1280.
- Breman AM, Ramocki MB, Kang SH, Williams M, Freedenberg D, Patel A *et al.* *MECP2* duplications in six patients with complex sex chromosome rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2011; 409-415.
- Buckland PR. Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans. *Ann Med* 2003; 308-315.
- Cantagrel V, Lossi AM, Boulanger S, Depetris D, Mattei MG, Géczy J *et al.* Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males. *J Med Genet* 2004; 736-742.
- Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 Inhibits Hedgehog Signaling during Development by Competing with Patched for Hedgehog Binding. *Dev Cell* 2008; 700-711.
- Carreira IM, Ferreira SI, Matoso E, Pires LM, Ferrão J, Jardim A *et al.* Copy number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet* 2015; 8:103.
- 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 Xlinked mental retardation. *Nat Genet* 1999; 25-31.
- Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino CA *et al.* Complex rearrangements in patients with duplications of *MECP2* can occur by fork stalling and template switching. *Hum Mol Genet* 2009; 2188-2203.
- Castrillon DH, Wasserman AS. Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* 1994; 3367-3377.

- Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J *et al.* MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 2008; 1224-1229.
- Chan ES, Pawel BR, Corao DA, Venneti S, Russo P, Santi M *et al.* Immunohistochemical expression of glypican-3 in pediatric tumors: an analysis of 414 cases. *Pediatr Dev Pathol* 2013; 272-277.
- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 2006; 701-713.
- Chiao E, Fisher P, Crisponi L, Deiana M, Dragatsis I, Schlessinger D *et al.* Overgrowth of a mouse model of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome is independent of IGF signaling. *Dev Biol* 2002; 185-206.
- Chiu JC, Ko HW, Edery I. NEMO/NLK phosphorylates PERIOD to initiate a time-delay phosphorylation circuit that sets circadian clock speed. *Cell* 2011; 357-370.
- Chiurazzi P, Hamel BCJ, Neri G. XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet* 2001; 71-81.
- Chiurazzi P, Oostra BA. Genetics of mental retardation. *Curr Opin Pediatr* 2000; 529-535.
- Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. *F1000Res* 2016; Apr 7;5.
- Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet* 2008; 422-434.
- Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A *et al.* Partial tandem duplication of *GRIA3* in a male with mental retardation. *Am J Med Genet* 2007; 1448-1455.
- Choi BY, Kim DH, Chung T, Chang M, Kim EH, Kim AR *et al.* Destabilization and mislocalization of *POU3F4* by C-terminal frameshift truncation and extension mutation. *Hum Mutat* 2013; 309-316.
- Claes S, Vogels A, Holvoet M, Devriendt K, Raeymaekers P, Cassiman JJ *et al.* Regional localization of two genes for nonspecific X-linked mental retardation to Xp22.3-p22.2 (MRX49) and Xp11.3-p11.21 (MRX50). *Am J Med Genet* 1997; 474-479.
- Clark AR, Sawyer GM, Robertson SP, Sutherland-Smith AJ. Skeletal dysplasias due to filamin A mutations result from a gain-of-function mechanism distinct from allelic neurological disorders. *Hum Mol Genet* 2009; 4791-800.
- Clayton-Smith J, Walters S, Hobson E, Burkitt-Wright E, Smith R, Toutain A *et al.* Xq28 duplication presenting with intestinal and bladder dysfunction and a distinctive facial appearance. *Eur J Hum Genet* 2009; 434-443.

Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL *et al.* Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated *FMR1* DNA. *Am J Hum Genet* 2009; 503-514.

Collins AL, Levenson JM, Vilaythong AP, Richman R, Armstrong DL, Noebels JL *et al.* Mild overexpression of *MECP2* causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet* 2004; 2679-2689.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 2010; 704-712.

Conte MI, Pescatore A, Paciolla M, Esposito E, Miano MG, Lioi MB *et al.* Insight into *IKBKKG/NEMO* locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease. *Hum Mutat* 2014; 165-177.

Corvino V, Apisa P, Malesci R, Laria C, Auletta G, Franzé A. X-Linked Sensorineural Hearing Loss: A Literature Review. *Curr Genomics* 2018; 327-338.

Cottureau E, Moizard MP, David A, Raynaud M, Marmin N, Toutain A. Duplication of exon 2 of the *GPC3* gene in a case of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet A* 2014; 282-284.

Cottureau E, Mortemousque I, Moizard MP, Bürglen L, Lacombe D, Gilbert-Dussardier B *et al.* Phenotypic spectrum of Simpson-Golabi-Behmel syndrome in a series of 42 cases with a mutation in *GPC3* and review of the literature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2013; 92-105.

Coussa RG, Traboulsi EL. Choroideremia: a review of general findings and pathogenesis. *Ophthalmic Genet* 2012; 57-65.

Cremers FP, Sankila EM, Brunsmann F, Jay M, Jay B, Wright A *et al.* Deletions in patients with classical choroideremia vary in size from 45 kb to several megabases. *Am J Hum Genet* 1990; 622-628.

D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F *et al.* Mutations in *GDII* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* 1998; 134-139.

D'Arca D, Zhao X, Xu W, Ramirez-Martinez NC, Iavarone A, Lasorella A. Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 5875-5880.

Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F *et al.* Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Molec Genet* 2009; 3779-3794.

de Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BB *et al.* Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. *Hum Mutat* 2007; 207-208.

de Lange IM, Helbig KL, Weckhuysen S, Moller RS, Velinov M, Dolzhanskaya N *et al.* *De novo* mutations of *KIAA2022* in females cause intellectual disability and intractable epilepsy. *J Med Genet* 2016; 850-858.

de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, Kleefstra T, Kroes T *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012; 1921-1929.

de Vries BBA, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile X syndrome. *J Med Genet* 1998; 579-589.

de Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID *et al.* Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 145-150.

del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG *et al.* Increased *MECP2* gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med* 2006; 784-792.

des Portes V. X-linked mental deficiency. *Handb Clin Neurol* 2013; 297-306.

Du YZ, Srivastava AK, Schwartz CE. Multiple exon screening using restriction endonuclease fingerprinting (REF): Detection of six novel mutations in the L1 cell adhesion molecule (*L1CAM*) gene. *Hum Mutat* 1998; 222-230.

El Chehadeh S, Touraine R, Prieur F, Reardon W, Bienvenu T, Chantot-Bastaraud S *et al.* Xq28 duplication including *MECP2* in six unreported affected females: what can we learn for diagnosis and genetic counselling? *Clin Genet* 2017; 576-588.

El-Hattab AW, Fang P, Jin W, Hughes JR, Gibson JB, Patel GS *et al.* *Int22h-1/int22h-2*-mediated Xq28 rearrangements: Intellectual disability associated with duplications and in utero male lethality with deletions. *J Med Genet* 2011; 840-850.

Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med* 2013; 441-450.

Ensembl Genome Browser. Disponível em <http://www.ensembl.org>, acesso em 10/05/2019.

Epi 4K Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N *et al.* *De novo* mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013; 217-221.

Fassio A, Patry L, Congia S, Onofri F, Piton A, Gauthier J *et al.* *SYN1* loss-of-function mutations in autism and partial epilepsy cause impaired synaptic function. *Hum Molec Genet* 2011; 2297-2307.

Feero GW, Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--an updated primer. *N Engl J Med* 2002; 2001-2011.

Fernandez-Moreira D, Ugalde C, Smeets R, Rodenburg RJT, Lopez-Laso E, Ruiz-Falco ML *et al.* X-linked *NDUFA1* gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Neurol* 2007; 73-83.

Fernández RM, Núñez-Torres R, González-Meneses A, Antiñolo G, Borrego S. Novel association of severe neonatal encephalopathy and Hirschsprung disease in a male with a duplication at the Xq28 region. *BMC Med Genet* 2010; 11: 137.

Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 2006; Spec No 1, R57-66.

Field M, Tarpey PS, Smith R, Edkins S, O'Meara S, Stevens C *et al.* Mutations in the *BRWD3* gene cause X-linked mental retardation associated with macrocephaly. *Am J Hum Genet* 2007; 367-374.

Filges I, Rothlisberger B, Blattner A, Boesch N, Demougin P, Wenzel F *et al.* Deletion in Xp22.11: *PTCHD1* is a candidate gene for X-linked intellectual disability with or without autism. *Clin Genet* 2011; 79-85.

Filmus J, Capurro M. The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer. *Cell Cycle* 2008; 2787-2790.

Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol* 2008; 9(5):224.

Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 310-316.

Flynn M, Zou YS, Milunsky A. Whole gene duplication of the *PQBP1* gene in syndrome resembling Renpenning. *Am J Med Genet Part A* 2011; 141-144.

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 Part A* 2011; 1109-1114.

Freude K, Hoffmann K, Jensen LR, Delatycki MB, Des Portes V, Moser B *et al.* Mutations in the *FTSJ1* gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004; 305-309.

Friesema ECH, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M *et al.* Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 2004; 1435-1437.

Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, Gormley P *et al.* *De novo* mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 2014; 179-184.

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; 252-264.

Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C *et al.* Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase *HSD17B10* and the E3 ubiquitin ligase *HUWE1* are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008; 432-443.

Fusco F, D'Urso M, Miano MG, Ursini MV. The LCR at the *IKBKG* locus is prone to recombine. *Am J Hum Genet* 2010; 650-652.

Fusco F, Paciolla M, Napolitano F, Pescatore A, D'Addario I, Bal E *et al.* Genomic architecture at the Incontinentia Pigmenti locus favours de novo pathological alleles through different mechanisms. *Hum Mol Genet* 2012; 1260-1271.

Gallagher A, Hallahan B. Fragile X-associated disorders: a clinical overview. *J Neurol* 2012; 401-413.

Gandomi SK, Farwell Gonzalez KD, Parra M, Shahmirzadi L, Mancuso J, Pichurin P *et al.* Diagnostic exome sequencing identifies two novel *IQSEC2* mutations associated with X-linked intellectual disability with seizures: implications for genetic counseling and clinical diagnosis. *J Genet Couns* 2014; 289-298.

Garcia CC, Blair HJ, Seager M, Coulthard A, Tennant S, Buddles M *et al.* Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet* 2004; 183-187.

García-Cazorla A, Wolf NI, Serrano M, Moog U, Pérez-Dueñas B, Póo P *et al.* Mental retardation and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009; 597-608.

Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. *Oxford University Press* 2004; Nova Iorque, 3^{ed}.

Gécz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene *FMR2*, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 1996; 105-108.

Gécz J, Shoubridge C, Corbett M. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends Genet* 2009; 308-316.

Gedeon A, Kerr B, Mulley J, Turner G. Localisation of the *MRX3* gene for non-specific X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991; 372-377.

Gedeon A, Kerr B, Mulley J, Turner G. Pericentromeric genes for non-specific X-linked mental retardation (MRX). *Am J Med Genet* 1994; 553-564.

Geetha TS, Michealraj KA, Kabra M, Kaur G, Juyal RC, Thelma BK. Targeted deep resequencing identifies *MID2* mutation for X-linked intellectual disability with varied disease severity in a large kindred from India. *Hum Mutat* 2014; 41-44.

Genesio R, Mormile A, Licenziati MR, De Brasi D, Leone G, Balzano S *et al.* Short stature and primary ovarian insufficiency possibly due to chromosomal position effect in a balanced X;1 translocation. *Mol Cytogenet* 2015; 8:50.

Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E *et al.* Mutations in the small GTPase gene *RAB39B* are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am J Hum Genet* 2010; 185-195.

Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, *et al.* Mutations in *ATRX*, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000; 368-371.

Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs D. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 1995; 837-845.

Gijsbers AC, den Hollander NS, Helderma-van de Enden AT, Schuurs-Hoeijmakers JH, Vijfhuizen L, Bijlsma EK *et al.* X-chromosome duplications in males with mental retardation: pathogenic or benign variants? *Clin Genet* 2011; 71-78.

Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH *et al.* Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014; 344-347.

Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012; 490-497.

Giordano M, Gertosio C, Pagani S, Meazza C, Fusco I, Bozzola E *et al.* A 5.8 Mb interstitial deletion on chromosome Xq21.1 in a boy with intellectual disability, cleft palate, hearing impairment and combined growth hormone deficiency. *BMC Med Genet* 2015; 16: 74.

Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, Fichera M, Novara F, Magini P *et al.* Complex segmental duplications mediate recurrent dup(X)(p11.22p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. *Am J Hum Genet* 2009; 394-400.

Golabi M, Rosen L. A new X-linked mental retardation-overgrowth syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 345-358.

Gonzales ML, LaSalle JM. The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders. *Curr Psychiatry Rep* 2010; 127-134.

Gottipati S, Rao NL, Fung-Leung WP. *IRAK1*: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal* 2008; 269-276.

Grau C, Starkovich M, Azamian MS, Xia F, Cheung SW, Evans P *et al.* Xp11.22 deletions encompassing *CENPVL1*, *CENPVL2*, *MAGED1* and *GSPT2* as a cause of syndromic X-linked intellectual disability. *PLoS One* 2017; 12(4), e0175962.

Graves JA, Gécz J, Hameister H. Evolution of the human X - a smart and sexy chromosome that controls speciation and development. *Cytogenet Genome Res* 2002; 141-145.

Greenwood Genetic Center. V. Summary of XLID Maps and Gene: Updated Dec 2017. Disponível em: <https://www.ggc.org/xlid-genetic-research>, acesso em 10/05/2019.

Grotto S, Drouin-Garraud V, Ounap K, Puusepp-Benazzouz H, Schuurs-Hoeijmakers J, Le Meur N *et al.* Clinical assessment of five patients with *BRWD3* mutation at Xq21.1 gives further evidence for mild to moderate intellectual disability and macrocephaly. *Eur J Med Genet* 2014; 200-206.

Gu W, Sander T, Heils A, Lenzen KP, Steinlen OK. A new EF-hand containing gene *EFHC2* on Xp11.4: tentative evidence for association with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* 2005; 91-98.

Hackett A, Tarpey PS, Licata A, Cox J, Whibley A, Boyle J *et al.* *CASK* mutations are frequent in males and cause X-linked nystagmus and variable XLMR phenotypes. *Eur J Hum Genet* 2010; 544-552.

Hagens O, Dubos A, Abidi F, Barbi G, Van Zutven L, Hoeltzenbein M *et al.* Disruptions of the novel *KIAA1202* gene are associated with X-linked mental retardation. *Hum Genet* 2006;578-590.

Khayat W, Hackett A, Shaw M, Ilie A, Dudding-Byth T, Kalscheuer VM *et al.* A recurrent missense variant in *SLC9A7* causes nonsyndromic X-linked intellectual disability with alteration of Golgi acidification and aberrant glycosylation. *Hum Molec Genet* 2019; 598-614.

Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Horne D, Wood TC, Taylor HA, Schroer RJ *et al.* X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (*SLC6A8*) located in Xq28. *Am J Hum Genet* 2002; 1349-1356.

Halvardson J, Zhao JJ, Zaghlool A, Wentzel C, Georgii-Hemming P, Månsson E *et al.* Mutations in *HECW2* are associated with intellectual disability and epilepsy. *J Med Genet* 2016; doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103814.

Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi JM, Daoud H, Nassif C, Patry L *et al.* *De novo* mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS Genet* 2014; doi: 10.1371/journal.pgen.1004772.

Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G. Fragile X syndrome and deletions in *FMRI*: new case and review of the literature. *Am J Med Genet* 1997; 430-434.

Helsmoortel C, Vandeweyer G, Ordoukhanian P, van Nieuwerburgh F, van der Aa N, Kooy RF. Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family based whole exome sequencing. *Clin Genet* 2014; 140-148.

Henrique PP. Investigação de microrrearranjos no cromossomo X pela técnica de MLPA em indivíduos do sexo masculino com deficiência intelectual de causa indeterminada. [Dissertação de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2015.

Hinze SJ, Jackson MR, Lie1 S, Jolly L, Field M, Barry SC *et al.* Incorrect dosage of *IQSEC2*, a known intellectual disability and epilepsy gene, disrupts dendritic spine morphogenesis. *Transl Psychiatry* 2017; 7(5), e1110.

Hirota Y, Minami T, Sato T, Yokomizo A, Matsumoto A, Goto M *et al.* Xq26.1-26.3 duplication including *MOSPD1* and *GPC3* identified in boy with short stature and double outlet right ventricle. *Am J Med Genet A* 2017; 2446-2450.

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; 1673-1681.

Holden ST, Clarkson A, Thomas NS, Abbott K, James MR, Willatt L. A *de novo* duplication of Xp11.22-p11.4 in a girl with intellectual disability, structural brain anomalies, and preferential inactivation of the normal X-chromosome. *Am J Med Genet A* 2010; 1735-1740.

Homan CC, Kumar R, Nguyen LS, Haan E, Raymond FL, Abidi F *et al.* Mutations in *USP9X* are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am J Hum Genet* 2014; 470-478.

Hombria JC, Brown S. The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* 2002; 20;12(16):R569-75.

Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E *et al.* Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet* 2010; 590-599.

Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S *et al.* The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving *MECP2* is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A* 2012; 1292-1303.

Hoppman-Chaney N, Jang JS, Jen J, Babovic-Vuksanovic D, Hodge JC. In-frame multi-exon deletion of *SMC1A* in a severely affected female with Cornelia de Lange Syndrome. *Am J Med Genet A* 2012; 193-198.

Houge G, Rasmussen IH, Hovland R. Loss-of-function *CNKSR2* mutation is a likely cause of non-syndromic X-linked intellectual disability. *Mol Syndromol* 2012; 60-63.

Hu H, Haas SA, Chelly J, van Esch H, Raynaud M, de Brouwer AP *et al.* X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry* 2016; 133-148.

Huang L, Jolly LA, Willis-Owen S, Gardner A, Kumar R, Douglas E *et al.* A noncoding, regulatory mutation implicates *HCFC1* in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2012; 694-702.

Huddleston LB, Visootsak J, Sherman SL. Cognitive aspects of fragile X syndrome. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 2014; 501-508.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE. Censo demográfico 2010. Características gerais da população. IBGE 2010; Rio de Janeiro, 1-178.

Isrie M, Kalscheuer VM, Holvoet M, Fieremans N, van Esch H, Devriendt K. *HUWE1* mutation explains phenotypic severity in a case of familial idiopathic intellectual disability. *Eur J Med Genet* 2013; 379-382.

Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins *NLGN3* and *NLGN4* are associated with autism. *Nature Genet* 2003; 27-29.

Jensen LR, Amende M, Gurok U, Moser B, Gimmel V, Tzschach A *et al.* Mutations in the *JARID1C* gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005; 227-236.

Jin Z, Yu L, Geng J, Wang J, Jin X, Huang H. A novel 47.2 Mb duplication on chromosomal bands Xq21.1-25 associated with mental retardation. *Gene* 2015; 98-102.

Johnson CP, Walker Jr WO, Palomo-González SA, Curry CJ. Mental retardation: diagnosis, management, and family. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2006; 126-165.

Jorde LB, Bamshard MJ, White RL, Carey J. Genética Médica. Elsevier 2004; Rio de Janeiro, 3^{ed}.

Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Géczy J *et al.* Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet* 2003; 313-315.

Kalscheuer VM, James VM, Himelright ML, Long P, Oegema R, Jensen C *et al.* Novel missense mutation A789V in *IQSEC2* underlies X-linked intellectual disability in the MRX78 family. *Front Mol Neurosci* 2016; 8, 85. doi: 10.3389/fnmol.2015.00085.

Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord* 2010; 182-209.

Kehrer C, Hoischen A, Menkhaus R, Schwab E, Müller A, Kim S *et al.* Whole exome sequencing and array-based molecular karyotyping as aids to prenatal diagnosis in fetuses with suspected Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Prenat Diagn* 2016; 961-965.

Kidd SA, Lachiewicz A, Barbouth D, Blitz RK, Delahunty C, McBrien D *et al.* Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics* 2014; 995-1005.

Kirk EP, Malaty-Brevaud V, Martini N, Lacoste C, Levy N, Maclean K *et al.* The clinical variability of the *MECP2* duplication syndrome: description of two families with duplications excluding *LICAM* and *FLNA*. *Clin Genet* 2009; 75(3): 301-303.

Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Banning MJ, Kalscheuer VM, Chelly J *et al.* Zinc finger 81 (*ZNF81*) mutations associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet* 2004; 394-399.

Kleine-Kohlbrecher D, Christensen J, Vandamme J, Abarrategui I, Bak M, Tommerup N *et al.* A functional link between the histone demethylase *PHF8* and the transcription factor *ZNF711* in X-linked mental retardation. *Mol Cell* 2010; 165-178.

Kochinke K, Zweier C, Nijhof B, Fenckova M, Cizek P, Honti F *et al.* Systematic phenomics analysis deconvolutes genes mutated in intellectual disability into biologically coherent modules. *Am J Hum Genet* 2016; 149-164.

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I *et al.* Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat* 2009; 283-292.

Kramer JM, van Bokhoven H. Genetic and epigenetic defects in mental retardation. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 96-107.

Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol* 2012;5-14.

Kumar R, Corbett MA, van Bon BWM, Woenig JA, Weir L, Douglas E *et al.* *THOC2* mutations implicate mRNA-export pathway in X-linked intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2015; 302-310.

Kuroda Y, Ohashi I, Naruto T, Ida K, Enomoto Y, Saito T *et al.* Delineation of the *KIAA2022* mutation phenotype: two patients with X-linked intellectual disability and distinctive features. *Am J Med Genet Part A* 2015; 1-5.

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; 247-250.

Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller JM, Nelson SF *et al.* Disruption of *POF1B* binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2006; 113-119.

Lapunzina P. Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 53-71.

Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP *et al.* X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the *NLGN4* gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 2004; 552-557.

Lebel RR, May M, Pouls S, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. Non-syndromic X-linked mental retardation associated with a missense mutation (P312L) in the *FGD1* gene. *Clin Genet* 2002; 139-145.

Lehrke R. A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 1972; 611-619.

Lenski C, Kooy RF, Reyniers E, Loessner D, Wanders RJA, Winnepenninckx B *et al.* The reduced expression of the *HADH2* protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. *Am J Hum Genet* 2007; 372-377.

Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 117-134.

Lesca G, Moizard MP, Bussy G, Boggio D, Hu H, Haas SA *et al.* Clinical and neurocognitive characterization of a family with a novel *MED12* gene frameshift mutation. *Am J Med Genet A* 2013; 3063-3071.

Liang S, Jiang N, Li S, Jiang X, Yu D. A maternally inherited 8.05 Mb Xq21 deletion associated with Choroideremia, deafness, and mental retardation syndrome in a male patient. *Mol Cytogenet* 2017; 10:23.

Lim Z, Downs J, Wong K, Ellaway C, Leonard H. Expanding the clinical picture of the *MECP2* Duplication syndrome. *Clin Genet* 2017; 557-563.

Lincoln-de-Carvalho CR. Caracterização de uma amostra de indivíduos com deficiência intelectual de origem indeterminada: aspectos clínicos, citogenéticos e moleculares. [Tese de Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2017.

Long P, May MM, James VM, Grannò S, Johnson JP, Tarpey P *et al.* Missense mutation R338W in *ARHGEF9* in a family with X-linked intellectual disability with variable macrocephaly and macro-orchidism. *Front Mol Neurosci* 2016; 8:83.

Lossi AM, Laugier-Anfossi F, Depetris D, Géczy J, Gedeon A, Kooy F *et al.* Abnormal expression of the *KLF8* (*ZNF741*) gene in a female patient with an X;autosome translocation t(X;21)(p11.2;q22.3) and non-syndromic mental retardation. *J Med Genet* 2002; 113-117.

Lubs H, Abidi F, Bier JA, Abuelo D, Ouzts L, Voeller K *et al.* XLMR syndrome characterized by multiple respiratory infections, hypertelorism, severe CNS deterioration and early death localizes to distal Xq28. *Am J Med Genet* 1999; 243-248.

Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am J Hum Genet* 2012; 579-590.

Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A *et al.* Structural variation in Xq28: *MECP2* duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 2009; 444-453.

Lugtenberg D, Veltman JA, van Bokhoven H. High-resolution genomic microarrays for X-linked mental retardation. *Genet Med* 2007; 560-565.

Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L *et al.* ZNF674: a new Kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006; 265-278.

Madrigal I, Alvarez-Mora MI, Rosell J, Rodríguez-Revenge L, Karlberg O, Sauer S *et al.* A novel splicing mutation in the *IQSEC2* gene that modulates the phenotype severity in a family with intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 2016; 1-7.

Madrigal I, Fernández-Burriel M, Rodríguez-Revenge 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; 822-826.

Madrigal I, Rodríguez-Revenge L, Armengol L, González E, Rodríguez B, Badenas C *et al.* X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics* 2007b; 8: 443.

Madrigal I, Rodríguez-Revenge L, Badenas C, Sánchez A, Martínez 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* 2007a; 117-122.

Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 2011; 580-589.

Mandel JL, Chelly J. Monogenic Xlinked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the *ARX* (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 689-693.

Mansouri MR, Marklund L, Gustavsson P, Davey E, Carlsson B, Larsson C *et al.* Loss of *ZDHC15* expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation. *Europ J Hum Genet* 2005; 970-977.

Maranduba CMC, Friesema ECH, Kok F, Kester MHA, Jansen J, Sertie AL *et al.* Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *J Med Genet* 2006; 457-460.

Maranduba CMC, Moreira ES, Orabona GM, Pavanello RC, Vianna-Morgante AM, Passos-Bueno MR. Does the P172H mutation at the *TM4SF2* gene cause X-linked mental retardation? (Letter) *Am J Med Genet* 2004; 413-415.

Mata IF, Jang Y, Kim C-H, Hanna DS, Dorschner MO, Samii A *et al.* The *RAB39B* p.G192R mutation causes X-linked dominant Parkinson's disease. *Molec Neurodegener* 2015; 10: 50.

Mateos ME, Beyer K, López-Laso E, Siles JL, Pérez-Navero JL, Peña MJ *et al.* Simpson-Golabi-Behmel syndrome type 1 and hepatoblastoma in a patient with a novel exon 2-4 duplication of the *GPC3* gene. *Am J Med Genet A* 2013; 1091-1095.

Mathis JM, Simmons DM, He X, Swanson LW, Rosenfeld MG. Brain 4: a novel mammalian POU domain transcription factor exhibiting restricted brain-specific expression. *Eur Mol Biol Organ (EMBO) J* 1992; 2551-2561.

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; 755-757.

McMullan DJ, Bonin M, Hehir-Kwa JY, de Vries BB, Dufke A, Rattenberry E *et al.* Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Hum Mutat* 2009; 1082-1092.

McTaggart KE, Tran M, Mah DY, Lai SW, Nesslinger NJ, MacDonald IM. Mutational analysis of patients with the diagnosis of choroideremia. *Hum Mutat* 2002; 189-196.

Medrano S, Scrable H. Maintaining appearances--the role of p53 in adult neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 828-833.

Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med* 2012; 733-743.

Meins M, Lehmann J, Gerresheim F, Herchenbach J, Hagedorn M, Hameister K *et al.* Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the *MECP2* gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet* 2005; 42(2): e12.

Meloni I, Bruttini M, Longo I, Mari F, Rizzolio F, D'Adamo P *et al.* A mutation in the rett syndrome gene, *MECP2*, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet* 2000; 982-985.

Meloni I, Vitelli F, Pucci L, Lowry RB, Tonlorenzi R, Rossi E *et al.* Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *J Med Genet* 2002; 359-365.

Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Géczy J *et al.* A missense mutation in *RPS6KA3* (*RSK2*) responsible for non-specific mental retardation. *Nat Genet* 1999; 13-14.

Michaud JL, Lachance M, Hamdan FF, Carmant L, Lortie A, Diadori P *et al.* The genetic landscape of infantile spasms. *Hum Molec Genet* 2014; 4846-4858.

Minić S, Trpinac D, Obradović M. Systematic review of central nervous system anomalies in incontinentia pigmenti. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8:25.

Mitsios A, Dubis AM, Moosajee M. Choroideremia: from genetic and clinical phenotyping to gene therapy and future treatments. *Ther Adv Ophthalmol* 2018; 10:2515841418817490.

Moeschler JB, Shevell M, Committee on Genetics. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or developmental delay. *Pediatrics* 2014; 903-918.

Moey C, Hinze SJ, Brueton L, Morton J, McMullan DJ, Kamien B *et al.* Xp11.2 microduplications including *IQSEC2*, *TSPYL2* and *KDM5C* genes in patients with neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet* 2016; 373-380.

Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J *et al.* Oligosaccharyltransferase subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008; 1150-1157.

Møller RS, Jensen LR, Maas SM, Filmus J, Capurro M, Hansen C *et al.* X-linked congenital ptosis and associated intellectual disability, short stature, microcephaly, cleft palate, digital and genital abnormalities define novel Xq25q26 duplication syndrome. *Hum Genet* 2014; 625-638.

Moncini S, Bedeschi MF, Castronovo P, Crippa M, Calvello M, Garghentino RR *et al.* *ATRX* mutation in two adult brothers with non-specific moderate intellectual disability identified by exome sequencing. *Meta Gene* 2013; 102-108.

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; 4356-4364.

Morleo M, Iaconis D, Chitaya D, Peluso I, Marzella R, Renieri A *et al.* Disruption of the *IQSEC2* transcript in a female with X;autosome translocation t(X;20)(p11.2;q11.2) and a phenotype resembling X-linked infantile spasms (ISSX) syndrome. *Mol Med Rep* 2008; 33-39.

Mujezinović F, Krgović D, Blatnik A, Zagradišnik B, Vipotnik TV, Golec T *et al.* Simpson-Golabi-Behmel syndrome: a prenatal diagnosis in a foetus with *GPC3* and *GPC4* gene microduplications. *Clin Genet* 2016; 99-101.

Müller P, Kutenkeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP, Boutros M. Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 2005; 871-875.

Musio A, Selicorni A, Focarelli ML, Gervasini C, Milani D, Russo S *et al.* X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to *SMC1L1* mutations. *Nat Genet* 2006; 528-530.

Nagamani SCS, Erez A, Probst FJ, Bader P, Evans P, Baker LA *et al.* Small genomic rearrangements involving *FMRI* support the importance of its gene dosage for normal neurocognitive function. *Neurogenetics* 2012; 333-339.

Nava C, Lamar 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; e179.

Nawara M, Kłapecki 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* 2008; 3167-3172.

- Neira VA, Romero-Espinoza P, Rojas-Martínez A, Ortiz-López R, Córdova-Fletes C, Plaja A *et al.* De novo *MECP2* disomy in a Mexican male carrying a supernumerary marker chromosome and no typical Lubs syndrome features. *Gene* 2013; 381-385.
- Neri G, Marini R, Cappa M, Borrelli P, Opitz JM. Simpson-Golabi-Behmel syndrome: an X-linked encephalo-tropho-schisis syndrome. *Am J Med Genet* 1988; 287-299.
- Neri G, Marini R, Cappa M, Borrelli P, Opitz JM. Simpson-Golabi-Behmel syndrome: an X-linked encephalo-tropho-schisis syndrome. 1988. *Am J Med Genet A* 2013; 2697-2703.
- Neri G, Schwartz CE, Lubs HA, Stevenson RE. X-linked intellectual disability update 2017. *Am J Med Genet A* 2018; 1375-1388.
- Newman S, Hermetz KE, Wechselblatt B, Rudd MK. Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. *Am J Hum Genet* 2015; 208-220.
- Nguyen DK, Distèche CM. High expression of the mammalian X chromosome in brain. *Brain Res* 2006; 46-49.
- Nicholl J, Waters W, Mulley JC, Suwalski S, Brown S, Hull Y *et al.* Cognitive deficit and autism spectrum disorders: prospective diagnosis by array CGH. *Pathology* 2014; 41-45.
- Niranjan TS, Skinner C, May M, Turner T, Rose R, Stevenson R *et al.* Affected kindred analysis of human X chromosome exomes to identify novel X-linked intellectual disability genes. *PLoS One* 2015; 10:e0116454. 10.1371/journal.pone.0116454.
- Nizon M, Andrieux J, Rooryck C, de Blois MC, Bourel-Ponchel E, Bourgois B *et al.* Phenotype-genotype correlations in 17 new patients with an Xp11.23p11.22 microduplication and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2015; 111-122.
- 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; 454-464.
- Noor A, Whibley A, Marshall CR, Gianakopoulos PJ, Piton A, Carson AR *et al.* Disruption at the *PTCHD1* locus on Xp22.11 in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Sci Transl Med* 2010; 49-62.
- Ofman R, Ruiter JP, Feenstra M, Duran M, Poll-The BT, Zschocke J *et al.* 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency is caused by mutations in the *HADH2* gene. *Am J Hum Genet* 2003; 1300-1307.
- Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y *et al.* Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of *LICAM*. *J Hum Genet* 2004; 334-337.

Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization, OMS/WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (10th Revision Version). WHO, 2004. Disponível em <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online2004/fr-icd.htm>, acesso em 10/05/2019.

Orivoli S, Pavlidis E, Cantalupo G, Pezzella M, Zara F, Garavelli L *et al.* Xp11.22 microduplications including *HUWE1*: case report and literature review. *Neuroped* 2016; 51-56.

Orrico A, Lam C, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF *et al.* *MECP2* mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 2000; 285-278.

Otter M, Wevers M, Pisters M, Pfundt R, Vos Y, Jan Nieveelstein R *et al.* A novel mutation in *LICAM* causes a mild form of L1 syndrome: a case report. *Clin Case Rep* 2017; 1213-1217.

Padovano V, Lucibello I, Alari V, Della Mina P, Crespi A, Ferrari I *et al.* The *POF1B* candidate gene for premature ovarian failure regulates epithelial polarity. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 19):3356-68.

Pernelle J-J, Chafey P, Chelly J, Wahrmann JP, Kaplan J-C, Tome F *et al.* Nebulin seen in DMD males including one patient with a large DNA deletion encompassing the *DMD* gene. *Hum Genet* 1988; 78: 285.

Phelps PD, Reardon W, Pembrey M, Bellman S, Luxon L. X-linked deafness, stapes gushers and a distinctive defect of the inner ear. *Neuroradiology* 1991; 326-330.

Philibert RA, Winfield SL, Sandhu HK, Martin BM, Ginns EI. The structure and expression of the human neuroligin-3 gene. *Gene* 2000; 303-310.

Philip N, Chabrol B, Lossi AM, Cardoso C, Guerrini R, Dobyns WB *et al.* Mutations in the oligophrenin-1 gene (*OPHN1*) cause X linked congenital cerebellar hypoplasia. *J Med Genet* 2003; 441-446.

Philips AK, Sirén, A, Avela K, Somer M, Peippo M, Ahvenainen M *et al.* X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability--four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 49.

Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R *et al.* Mutations in *GPC3*, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 1996; 241-247.

Piton A, Redin C, Mandel JL. XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing. *Am J Hum Genet* 2013; 368-383.

Pollak A, Lechowicz U, Kędra A, Stawiński P, Rydzanicz M, Furmanek M *et al.* Novel and *De Novo* Mutations Extend Association of *POU3F4* with Distinct Clinical and Radiological Phenotype of Hearing Loss. *PLoS One* 2016; 11(12):e0166618.

Polychronakos C, Ku CS. Exome diagnostics: already a reality? *J Med Genet* 2013; 48:579. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100385.

Pouya AR, Abedine SS, Mansoorian N, Behjati F, Nikzat N, Mohseni M *et al.* Fragile X syndrome screening of families with consanguineous and non-consanguineous parents in the Iranian population. *Eur J Med Genet* 2009; 170-173.

Quillé ML, Carat S, Quéméner-Redon S, Hirchaud E, Baron D, Benech C *et al.* High-throughput analysis of promoter occupancy reveals new targets for *ARX*, a gene mutated in mental retardation and interneuronopathies. *PLoS One* 2011; e25181.

Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The *MECP2* duplication syndrome. *Am J Med Genet A* 2010; 1079-1088.

Raymond FL, Tarpey P. The genetics of mental retardation. *Hum Mol Genet* 2006; 110-116.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444-454.

Reijnders MRF, Zachariadis V, Latour B, Jolly L, Mancini GM, Pfundt R *et al.* *De novo* loss-of-function mutations in *USP9X* cause a female-specific recognizable syndrome with developmental delay and congenital malformations. *Am J Hum Genet* 2016; 373-381.

Rejeb I, Ben Jemaa L, Chaabouni H. X linked mental retardation. *Tunis Med* 2009; 311-318.

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; 1358-1363.

Rizzolio F, Bione S, Sala C, Goegan M, Gentile M, Gregato G *et al.* Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Hum Reprod* 2006; 1477-1483.

Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D *et al.* Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 2003; 487-491.

Roll P, Vernes SC, Bruneau N, Cillario J, Ponsole-Lenfant M, Massacrier A *et al.* Molecular networks implicated in speech-related disorders: *FOXP2* regulates the *SRPX2/uPAR* complex. *Hum Molec Genet* 2010; 4848-4860.

Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010; 161-187.

Ropers HH. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 241-250.

Ropers HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 260-269.

Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2005; 46-57.

Ross CA, Pickart CM. The ubiquitin–proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 2004; 703-711.

Russo S, Marchi M, Cogliati F, Bontai MT, Pintaudi M, Veneselli E *et al.* Novel mutations in the *CDKL5* gene, predicted effects and associated phenotypes. *Neurogenetics* 2009; 241-250.

Ryan AF, Crenshaw EB 3rd, Simmons DM. Gene expression in normal and abnormal inner ears. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 129-132.

Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ *et al.* X-linked creatine-transporter gene (*SLC6A8*) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; 1497-1500.

Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM *et al.* X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26(2-3): 309-318.

Sanlaville D, Schluth-Bolard C, Turleau C. Distal Xq duplication and functional Xq disomy. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4:4.

Sanmann JN, Bishay DL, Starr LJ, Bell CA, Pickering DL, Stevens JM *et al.* Characterization of six novel patients with *MECP2* duplications due to unbalanced rearrangements of the X chromosome. *Am J Med Genet A* 2012; 1285-1291.

Santos-Rebouças CB, Belet S, Guedes de Almeida L, Ribeiro MG, Medina-Acosta E, Bahia PR *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* 2014; 644-651.

Santos-Rebouças CB, de Almeida LG, Belet S, Dos Santos SR, Ribeiro MG, da Silva AF *et al.* Novel microduplications at Xp11.22 including *HUWE1*: clinical and molecular insights into these genomic rearrangements associated with intellectual disability. *J Hum Genet* 2015; 207-211.

Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM *et al.* Intellectual disability: definition, classification, and systems of supports. *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* 2010; 11 ed.

Schalock RL. The evolving understanding of the construct of intellectual disability. *J Intellect Dev Disabil* 2011; 223-233.

Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP *et al.* Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet.* 2007; 39(7Suppl):S7-15.

Schirwani S, Novelli A, Digilio MC, Bourn D, Wilson V, Roberts C *et al.* Duplications of *GPC3* and *GPC4* genes in symptomatic female carriers of Simpson-Golabi-Behmel syndrome type 1. *Eur J Med Genet* 2019; 243-247.

Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005; 699-670.

Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG *et al.* Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (*MCT8*) gene. *Am J Hum Genet* 2005; 41-53.

Seaver LH, He X-Y, Abe K, Cowan T, Enns GM, Sweetman L. A Novel Mutation in the *HSD17B10* gene of a 10-year-old boy with refractory epilepsy, choreoathetosis and learning disability. *PLoS One* 2011; 6(11), e27348.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 525-528.

Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR *et al.* Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A* 2008; 2242-1151.

Sharp AJ. Emerging Themes and New Challenges in Defining the Role of Structural Variation in Human Disease. *Hum Mut* 2009; 135-144.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H *et al.* Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004; 241-248.

Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M *et al.* *MECP2* duplication syndrome in both genders. *Brain Dev* 2013; 411-419.

Shimazaki T, Arsenijevic Y, Ryan AK, Rosenfeld MG, Weiss S. A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation. *Eur Mol Biol Organ (EMBO) J* 1999; 444-456.

Shoichet SA, Hoffmann K, Menzel C, Trautmann U, Moser B, Hoeltzenbein M *et al.* Mutations in the *ZNF41* gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2003; 1341-1354.

Shoubridge C, Tarpey PS, Abidi F, Ramsden SL, Rujirabanjerd S, Murphy *et al.* Mutations in the guanine nucleotide exchange factor gene *IQSEC2* cause nonsyndromic intellectual disability. *Nat Genet* 2010; 486-488.

Simpson JL, Landey S, New M, German J. A previously unrecognized X-linked syndrome of dysmorphia. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975; 18-24.

Snijders Blok L, Madsen E, Juusola J, Gilissen C, Baralle D, Reijnders MRF *et al.* Mutations in *DDX3X* are a common cause of unexplained intellectual disability with gender-specific effects on Wnt signaling. *Am J Hum Genet* 2015; 343-352.

Song MH, Lee HK, Choi JY, Kim S, Bok J, Kim UK. Clinical evaluation of DFN3 patients with deletions in the *POU3F4* locus and detection of carrier female using MLPA. *Clin Genet* 2010; 524-532.

Srour M, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch Dis Chil* 2014; 386-389.

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 Part A* 2011; 2003-2007.

Stevenson RE., Schwartz CE. X-linked intellectual disability: Unique vulnerability of the male genome. *Dev Disabil Res Rev* 2009; 361-368.

Stocco dos Santos RC, Castro NH, Lillia Holmes A, Becak W, Tackels-Horne D, Lindsey CJ *et al.* X-linked mental retardation syndrome: clinical elucidation and localization to Xp11.3-Xq21.3. *Am J Med Genet A* 2003; 255-259.

Stoeva RE, Grozdanova LI, Vermeesch JR, Kirchhoff M, Fryns JP, Ivanov IS *et al.* Clinical and molecular-cytogenetic studies of cryptic chromosome aberrations in individuals with idiopathic mental retardation and multiple congenital malformations. *Folia Med (Plovdiv)* 2008; 55-62.

Strobl-Wildemann G, Kalscheuer VM, Hu, H, Wrogemann K, Ropers HH, Tzschach A. Novel *GDII* mutation in a large family with nonsyndromic X-linked intellectual disability. *Am J Med Genet* 2011; 3067-3070.

Strørmme P, Mangelsdorf ME, Scheffer IE, Gécz J. Infantile spasms, dystonia, and other X-linked phenotypes caused by mutations in aristaless related homeobox gene, *ARX*. *Brain Dev* 2002a; 266-268.

Strørmme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SM, Bruyere H *et al.* Mutations in the human ortholog of aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet* 2002b; 441-445.

Suhl JA, Warren ST. Single-nucleotide mutations in *FMR1* reveal novel functions and regulatory mechanisms of the Fragile X syndrome protein *FMRP*. *J Exp Neurosci* 2015; 35-41.

Suthers GK, Turner G, Mulley JC. A non-syndromal form of X-linked mental retardation (XLMR) is linked to DXS14. *Am J Med Genet* 1988; 485-491.

Tan TY, Gordon CT, Amor DJ, Farlie PG. Developmental perspectives on copy number abnormalities of the 22q11.2 region. *Clin Genet* 2010; 201-218.

Tarpey PS, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, Cox C *et al.* Mutations in the *DLG3* gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004; 318-324.

Tarpey PS, Raymond FL, Nguyen LS, Rodriguez J, Hackett A, Vandeleur L *et al.* Mutations in *UPF3B*, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. *Nat Genet* 2007; 1127-1133.

Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C *et al.* A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* 2009; 535-543.

Tarpey PS, Stevens C, Teague J, Edkins S, O'Meara S, Avis T *et al.* Mutations in the gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, *AP1S2*, cause Xlinked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006; 1119-1124.

Tejada MI, Martínez-Bouzas C, García-Ribes A, Larrucea S, Acquadro F, Cigudosa JC *et al.* A child with mild X-linked intellectual disability and a microduplication at Xp22.12 including *RPS6KA3*. *Pediatrics* 2011; 1029-1033.

Tenorio J, Arias P, Martínez-Glez V, Santos F, García-Miñaur S, Nevado J *et al.* Simpson-Golabi-Behmel syndrome types I and II. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9:138.

Thevenon J, Michot C, Bole C, Nitschke P, Nizon M, Faivre L *et al.* *RPL10* mutation Segregating in a family with X-linked syndromic intellectual disability. *Am J Med Genet Part A* 2015; 1-5.

Thompson & Thompson. Genética Médica. Elsevier 2008; Rio de Janeiro, 7^{ed}.

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 Part A* 2010; 904-915.

Timal S, Hoischen A, Lehle L, Adamowicz M, Huijben K, Sykut-Cegielska J *et al.* Gene identification in the congenital disorders of glycosylation type I by whole-exome sequencing. *Hum Molec Genet* 2012; 4151-4161.

Tonne E, Holdhus R, Stansberg C, Stray-Pedersen A, Petersen K, Brunner HG *et al.* Syndromic X-linked intellectual disability segregating with a missense variant in *RLIM*. *Europ J Hum Genet* 2015; 1652-1656.

Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet* 2011; 117-126.

Tran Mau-Them F, Willems M, Albrecht B, Sanchez E, Puechberty J, Ende S *et al.* Expanding the phenotype of *IQSEC2* mutations: truncating mutations in severe intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 2014; 289-292.

Troester MM, Trachtenberg T, Narayanan V. A novel mutation of the *ARX* gene in a male with nonsyndromic mental retardation. *J Child Neurol* 2007; 744-748.

Turner G, Partington MW. Genes for intelligence on the X chromosome. *J Med Genet* 1991; 28:429.

Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M *et al.* Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 2015; 1513-1518.

Tzschach A, Lenzner S, Moser B, Reinhardt R, Chelly J, Fryns JP *et al.* Novel *JARID1C/SMCX* mutations in patients with X-linked mental retardation. *Hum Mutat* 2006; 27(4), 389.

Utin GE, Kiper PO, Alanay Y, Haliloğlu G, Aktaş D, Boduroğlu K *et al.* Searching for copy number changes in nonsyndromic X linked intellectual disability. *Mol Syndromol* 2012; 64-71.

Van Camp G, Vits L, Coucke P, Lyonnet S, Schrandt-Stumpel C, Darby J *et al.* A duplication in the *LICAM* gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 1993; 421-425.

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; 463-472.

van Esch, H. *MECP2* duplication syndrome. *Mol. Syndromol* 2012; 128-136.

van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K *et al.* Duplication of the *MECP2* region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 2005; 442-453.

van Esch H, Jansen A, Bauters M, Froyen G, Fryns J-P. Encephalopathy and bilateral cataract in a boy with an interstitial deletion of Xp22 comprising the *CDKL5* and *NHS* genes. *Am J Med Genet* 2007; 364-369.

van der Werf IM, Van Dijck A, Reyniers E, Helsmoortel C, Kumar AA, Kalscheuer VM *et al.* Mutations in two large pedigrees highlight the role of *ZNF711* in X-linked intellectual disability. *Gene* 2017; 92-98.

Vandewalle J, Langen M, Zschätzsch M, Nijhof B, Kramer JM, Brems H *et al.* Ubiquitin ligase *HUWE1* regulates axon branching through the Wnt/ β -Catenin pathway in a *Drosophila* model for intellectual disability. *PLoS One* 2013; e81791.

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; 809-822.

van Maldergem L, Hou Q, Kalscheuer VM, Rio M, Doco-Fenzy M, Medeira A *et al.* Loss of function of *KIAA2022* causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth. *Hum Molec Genet* 2013; 3306-3314.

Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, Wolf D, Sprissler R, Salogiannis J *et al.* Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia* 2013; 1270-1281.

Veltman JA, Brunner HG. *De novo* mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 2012; 565-575.

Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, 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; 905-914.

Verkerk AJMH, Zeidler S, Breedveld G, Overbeek L, Huigh D, Koster L *et al.* *CXorf56*, a dendritic neuronal protein, identified as a new candidate gene for X-linked intellectual disability. *Europ J Hum Genet* 2018; 552-560.

Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X *et al.* *AGTR2* mutations in X-linked mental retardation. *Science* 2002; 2401-2403.

Visser LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO *et al.* Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003; 1261-1270.

Visser LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet* 2010; 289-297.

Visser LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* 2016; 9-18.

Vos YJ, de Walle HE, Bos KK, Stegeman JA, Ten Berge AM, Bruining M *et al.* Genotype-phenotype correlations in L1 syndrome: a guide for genetic counselling and mutation analysis. *J Med Genet* 2010; 169-175.

Vuillaume ML, Moizard MP, Hammouche E, Delrue MA, Perrin L, Maftai C *et al.* Are all Xq26.2 duplications overlapping *GPC3* on array-CGH a cause of Simpson-Golabi-Behmel syndrome? When do we need transcript analysis? *Clin Genet* 2018; 1111-1113.

Wang Q, Yang J, Liu Y, Li X, Luo F, Xie J. A novel *SLC6A8* mutation associated with intellectual disabilities in a Chinese family exhibiting creatine transporter deficiency: case report. *BMC Med Genet* 2018; 19(1): 193.

Ward DI, Buckley BA, Leon E, Diaz J, Galegos MF, Hofherr S *et al.* Intellectual disability and epilepsy due to the K/L-mediated Xq28 duplication: Further evidence of a distinct, dosage-dependent phenotype. *Am J Med Genet A* 2018; 551-559.

Waterson J, Stockley TL, Segal S, Golabi M. Novel duplication in glypican-4 as an apparent cause of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet A* 2010; 3179-3181.

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; 2736-2750.

Webster R, Cho MT, Retterer K, Millan F, Nowak C, Douglas J *et al.* De novo loss of function mutations in *KIAA2022* are associated with epilepsy and neurodevelopmental delay in females. *Clin Genet* 2017; 756-763.

Weiss LA, Purcell S, Waggoner S, Lawrence K, Spektor D, Daly MJ *et al.* Identification of *EFHC2* as a quantitative trait locus for fear recognition in Turner syndrome. *Hum Molec Genet* 2007; 107-113.

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* 2010; 173-188.

Whitehead MT, Vezina G. Tuber cinereum diverticula in a 28-month-old with xq21 deletion syndrome. *Case Rep Radiol* 2014; 2014:413574.

Willemsen MH, Ba W, Wissink-Lindhout WM, de Brouwer APM, Haas SA, Bienek M *et al.* Involvement of the kinesin family members *KIF4A* and *KIF5C* in intellectual disability and synaptic function. *J Med Genet* 2014; 487-494.

Wilson GR, Sim JCH, McLean C, Giannandrea M, Galea CA, Riseley JR *et al.* Mutations in *RAB39B* cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with alpha-synuclein pathology. *Am J Hum Genet* 2014; 729-735.

Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T *et al.* Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc Nat Acad Sci* 2007; 18163-18168.

Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J *et al.* Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet* 2010; 11:72.

Wu H, Luo J, Yu H, Rattner A, Mo A, Wang Y *et al.* Cellular resolution maps of X chromosome inactivation: implications for neural development, function, and disease. *Neuron* 2014; 103-119.

Yamamoto T, Shimojima K, Shimada S, Yokochi K, Yoshitomi S, Yanagihara K *et al.* Clinical impacts of genomic copy number gains at Xq28. *Hum Genome Var* 2014; 1: 14001.

Yan J, Zhang F, Brundage E, Scheuerle A, Lanpher B, Erickson RP *et al.* Genomic duplication resulting in increased copy number of genes encoding the sister chromatid cohesion complex conveys clinical consequences distinct from Cornelia de Lange. *J Med Genet* 2009; 626-634.

Yi JJ, Ehlers MD. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacological Reviews* 2007; 14-39.

Yi Z, Pan H, Li L, Wu H, Wang S, Ma Y *et al.* Chromosome Xq28 duplication encompassing *MECP2*: Clinical and molecular analysis of 16 new patients from 10 families in China. *Eur J Med Genet* 2016; 347-353.

Yim SY, Jeon BH, Yang JA, Kim HJ. Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. *J Korean Med Sci* 2008; 470-476.

Yon DK, Park JE, Kim SJ, Shim SH, Chae KY. A sibship with duplication of Xq28 inherited from the mother; genomic characterization and clinical outcomes. *BMC Med Genet* 2017; 18(1): 30.

Yntema HG, Poppelaars FA, Derksen E, Oudakker AR, Van Roosmalen T, Jacobs A *et al.* Expanding phenotype of *XNP* mutations: mild to moderate mental retardation. *Am J Med Genet* 2002; 243-247.

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; 465-471.

Zahir F, Friedman JM. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research. *Clin Genet* 2007; 271-287.

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

Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P *et al.* A new gene involved in Xlinked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet* 2000; 167-170.

Zerem A, Haginoya K, Lev D, Blumkin L, Kivity S, Linder I *et al.* The molecular and phenotypic spectrum of *IQSEC2*-related epilepsy. *Epilepsia* 2016; 1858-1869.

Zhao X, D'Arca D, Lim WK, Brahmachary M, Carro MS, Ludwig T *et al.* The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain. *Dev Cell* 2009; 210-221.

7. ANEXOS

7.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO CROMOSSOMO X EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL DE CAUSA INDETERMINADA

Pesquisador: Pamela Pontes Henrique

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 45740415.8.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.280.941

Apresentação do Projeto:

A deficiência intelectual ligada ao X (DILX) é uma das causas genéticas mais frequentes de deficiência intelectual (DI), ocorrendo em 10% a 12% de todos os homens afetados, provavelmente pelo maior número de genes do cromossomo X em comparação a qualquer segmento autossômico. Cerca de 100 genes seriam determinantes de DILX, contudo, mesmo com o conhecimento do papel de vários deles, há aspectos a serem elucidados, como a contribuição de cada um na determinação da DI ou ainda as correlações genótipo-fenótipo, cuja análise depende da investigação genética em indivíduos com DI idiopática. O objetivo da presente proposta é a investigar alterações em genes do cromossomo X em 100 indivíduos do sexo masculino com atraso global do desenvolvimento ou DI de origem indeterminada. Tal estudo será complementar ao projeto de pesquisa que analisou indivíduos com DI (REF CEP: Nº 252.097 / CAAE 09052712.5.0000.5404), avaliando aqueles cuja etiologia permaneceu indeterminada após realização dos exames propostos no mesmo. Para esses, será realizada a investigação de variações no número de cópias de DNA (CNVs – Copy Number Variations) pelo método array Comparative Genomic Hybridization (array-CHG). A análise dos dados será descritiva, com embasamento em artigos e banco de dados e com validação dos resultados por técnica independente. O aumento na

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.280.941

identificação das causas de DI pela aplicação dessas técnicas deverá contribuir para o conhecimento dessa condição, aprimorando o processo de determinação do diagnóstico etiológico e do aconselhamento genético das famílias envolvidas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigação de alterações em genes do cromossomo X em indivíduos do sexo masculino com atraso global do desenvolvimento ou DI de causa não esclarecida.

Objetivo Secundário: Revisão e atualização da literatura quanto à investigação genética em deficiência intelectual de causa indeterminada, com ênfase na DILX; Aplicação da técnica de array-CHG para investigar a presença de CNVs em genes do cromossomo X; Analisar a relevância patogênica das alterações encontradas e confirma-las por técnica independente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações da pesquisadora:

Riscos: Os riscos estão associados ao procedimento de coleta de sangue, porém são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta, que será realizada por profissional treinado e habilitado.

Benefícios: Como benefício desse estudo, espera-se pesquisar possíveis alterações no material genético dos indivíduos investigados, ou mesmo de seus genitores, as quais possam se relacionar ao problema que apresentam.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Critério de Inclusão: Serão incluídos indivíduos com atraso global do desenvolvimento ou DI, estudados por Lincoln-de-Carvalho (2009) e REF CEP: N° 252.097 /CAAE 09052712.5.0000.5404, que obtiveram resultados normais nos exames propostos.

Critério de Exclusão: Serão critérios de exclusão: a determinação do diagnóstico etiológico durante a execução do exames propostos pelos estudos anteriores Lincoln-de- Carvalho (2009) e REF CEP: N° 252.097 /CAAE 09052712.5.0000.5404, a ausência de atraso global do desenvolvimento ou DI e a recusa na participação da pesquisa pela não assinatura do termo de Reconsentimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguinte documentos:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.280.941

- 1-Informações básicas do projeto (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_516934.pdf 05/10/2015 21:00:13);
- 2-Projeto detalhado (Proj_doc2015_Pamela141104_1.pdf 05/10/2015 11:22:18);
- 3-Folha de rosto (Folha.pdf 05/10/2015 11:21:23);
- 4- Termo de consentimento (Termo_Reconsentimento_ProjetoPamela_vs2.pdf 05/10/2015 11:18:44);
- 5- Carta resposta (Carta_Ao_CEP_2015.pdf 05/10/2015 11:19:22).

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram esclarecidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.280.941

projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_516934.pdf	05/10/2015 21:00:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_doc2015_Pamela141104_1.pdf	05/10/2015 11:22:18	Pamela Pontes Henrique	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	05/10/2015 11:21:23	Pamela Pontes Henrique	Aceito
Outros	Carta_Ao_CEP_2015.pdf	05/10/2015 11:19:22	Pamela Pontes Henrique	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Reconsentimento_ProjetoPamela_vs2.pdf	05/10/2015 11:18:44	Pamela Pontes Henrique	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.280.941

CAMPINAS, 14 de Outubro de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

7.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas (FCM)
Departamento de Genética Médica

Título do projeto: AMPLIAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO GENÉTICA EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL DE ORIGEM INDETERMINADA: ASSOCIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS CITOGENÉTICAS E MOLECULARES.

Responsáveis: Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho, Pamela Pontes Henrique, Antonia Paula Marques de Faria e Maricilda P. de Mello.

Eu entendo que eu fui ou meu/minha filho(a) foi convidado(a) a participar de projeto de pesquisa envolvendo pessoas com deficiência intelectual (DI) ou atraso do desenvolvimento neuromotor de causa não esclarecida. O objetivo geral do estudo é investigar alterações nos cromossomos pelas técnicas de MLPA e aGH.

Concordando em participar, responderei perguntas sobre nosso histórico familiar e médico. Será coletada uma amostra de sangue de meu/minha filho(a) e, quando necessário, minha e do(a) pai(mãe). A amostra terá de 10 a 15 ml (ou uma colher de sopa); a coleta será feita por profissional habilitado, em geral no braço; os riscos são mínimos, como dor e manchas roxas (equimoses) no local. Conforme os resultados, será feita outra coleta para confirmação.

Fui informado(a) que a única vantagem dessa participação será conhecer uma possível alteração nos cromossomos do meu filho(a) ou mesmo nos meus, a qual poderá se relacionar ao problema que ele(a) apresenta. Sendo encontrada alguma alteração, logo serei comunicado(a) e orientado(a) sobre as consequências da mesma. A esse respeito, fui informado(a) que na rotina do atendimento do Serviço de Genética Clínica do HC-UNICAMP é realizado o aconselhamento genético, por médicos especialistas em Genética Médica e que, caso tenha interesse, serão agendadas consultas específicas para complementar esse procedimento, que inclui explicações detalhadas sobre a condição genética que meu filho(a) apresenta, as alternativas para melhorar seu desenvolvimento e qualidade de vida, prevenir eventuais complicações relacionadas a seu problema e ainda as chances de recorrência em outros familiares. Em caso de dúvida, a qualquer momento poderei contatar a FCM-UNICAMP, na pessoa da Dra. Antonia Paula Marques de Faria (fones: 19-3521.8908 ou 3521.8907).

Estou ciente que a participação é voluntária e não haverá nenhuma despesa, pois a coleta será feita durante consultas regulares no HC-UNICAMP. Posso recusar ou retirar meu consentimento e interromper a participação do meu/minha filho(a) a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue), sem interromper os cuidados médicos que ela(a) recebe ou receberá nesse hospital. Entendo que toda informação médica, assim como os resultados deste estudo serão sigilosos; se resultados, informações e fotografias forem utilizados em publicação científica, não serão identificados de qualquer forma.

Confirmo que a Dra. Antonia P. Marques de Faria ou o(a) médico(a) responsável Dr.(a)._____ explicou objetivos e procedimentos, além de riscos ou desconfortos advindos deste projeto. Li, ou me foi explicado, e compreendi este formulário e concordo com a participação de meu/minha filho(a). Assinarei duas vias deste termo, uma ficará comigo e outra com os pesquisadores responsáveis. **Em caso de dúvidas ou reclamações, fui informado que poderei contatar o Comitê de Ética da FCM-UNICAMP, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – CEP 13083-887 Campinas, SP; fones:19-3521.8936 ou 3521-7187, e-mail: cep@fcm.unicamp.br.**

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

() Concordo em participar desta pesquisa, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do material biológico, que deverá ser descartado ao final da mesma.

() Concordo em participar desta pesquisa e AUTORIZO o armazenamento do material biológico, mediante o meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Concordo em participar desta pesquisa e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando o meu consentimento a cada nova pesquisa, desde que a mesma seja aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Nome do sujeito da pesquisa

RG

Nome do responsável legal

RG

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Local e Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei o objetivo deste estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir da pesquisa e me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao responsável pelo(a) participante.

Nome e assinatura do pesquisador

RG

Local e Data